

地衣類を構成する子囊菌類における  
ポリオール<sup>①</sup>の輸送および代謝に関する基礎的研究

平成31年（2019年）1月

千葉大学大学院園芸学研究科  
環境園芸学専攻生物資源科学コース

吉野 花奈美

(千葉大学審査学位論文)

地衣類を構成する子囊菌類における  
ポリオール<sup>1</sup>の輸送および代謝に関する基礎的研究

平成31年(2019年)1月

千葉大学大学院園芸学研究科  
環境園芸学専攻生物資源科学コース

吉野 花奈美

## 目次

第1章 序論.....	1
1.1 地衣類を構成する生物種.....	1
1.2 地衣共生における糖利用.....	1
1.3 ポリオールの特徴.....	2
1.4 本研究の目的.....	3
第2章 地衣化子嚢菌 <i>Ramalina conduplicans</i> の培養に最適な合成培地の検討.....	6
2.1 目的.....	6
2.2 材料および方法.....	7
2.2.1 試料の収集と形態観察による種同定.....	7
2.2.2 組織培養法による地衣化子嚢菌の分離.....	8
2.2.3 地衣体および培養菌体からのゲノム DNA 抽出および PCR.....	8
2.2.4 クローニングおよびシーケンシング.....	9
2.2.5 合成培地の条件.....	10
2.2.6 菌体生長量および二次代謝産物の測定.....	10
2.3 結果.....	11
2.3.1 採集した地衣類および分離培養株の同定.....	11
2.3.2 菌体生長量.....	11
2.3.3 二次代謝産物.....	12
2.4 考察.....	13
2.4.1 培地間での比較.....	13
2.4.2 炭素源の比較.....	13
2.4.3 二次代謝産物の比較.....	14
4.5 要約.....	15
第3章 地衣化子嚢菌 <i>Ramalina conduplicans</i> の <i>de novo</i> ゲノムシーケンス.....	21
3.1 目的.....	21
3.2 材料および方法.....	21
3.2.1 材料.....	21
3.2.2 ゲノム DNA の抽出.....	22
3.2.3 ライブラリ調整およびゲノムシーケンス.....	23
3.2.4 <i>de novo</i> アセンブリ.....	24
3.2.5 アノテーション.....	24
3.3 結果および考察.....	24
3.3.1 ゲノム DNA の品質チェック.....	24
3.3.2 ゲノムシーケンス.....	25
3.3.3 他の地衣化子嚢菌ゲノムとの <i>de novo</i> アセンブリの比較.....	25
3.3.4 アノテーションの評価.....	25

3.4 要約.....	26
第4章 ポリオール輸送体遺伝子候補の単離と分子系統学的解析.....	32
4.1 目的.....	32
4.2 材料および方法.....	34
4.2.1 材料.....	34
4.2.2 培養菌体からの全 RNA 抽出およびディジェネレート PCR.....	35
4.2.3 Rapid amplification of cDNA ends (RACE).....	36
4.2.4 アミノ酸配列の取得.....	36
4.2.5 アライメントおよび系統解析.....	38
4.2.6 各ゲノムにおけるポリオール輸送体タンパク質の数.....	38
4.3 結果および考察.....	39
4.3.1 ポリオール輸送体遺伝子候補の解析.....	39
4.3.2 子囊菌類におけるポリオール輸送体遺伝子の分子系統学的解析.....	39
4.3.3 ポリオール輸送体タンパク質数の比較.....	41
4.4 要約.....	42
第5章 地衣類を構成する子囊菌類におけるポリオールの資化性.....	59
5.1 目的.....	59
5.2 材料および方法.....	61
5.2.1 試料の採集, 形態観察および化学成分分析による種同定.....	61
5.2.2 菌類の分離培養.....	61
5.2.3 菌類の分子同定.....	62
5.2.4 ポリオールの資化性.....	63
5.3 結果.....	64
5.3.1 標本の同定.....	64
5.3.2 地衣類を構成する真菌類の群集構造.....	65
5.3.3 菌体乾重量の比較.....	66
5.4 考察.....	67
5.5 要約.....	71
第6章 総合考察.....	85
要約.....	89
引用文献.....	90
謝辞.....	113

## 第1章 序論

### 1.1 地衣類を構成する生物種

地衣類とは、真菌が主要骨格を成し、緑藻またはシアノバクテリアが菌糸に取り囲まれるように共存する共生体を指す。命名規約上、地衣類の学名は真菌類に対して与えられ(以下、地衣化する真菌全体を共生菌とする)、共生する緑藻またはシアノバクテリア(以下、地衣化する緑藻およびシアノバクテリアを合わせて共生藻とする)はそれぞれの学名を持って分類される。共生菌は99%以上の種が子囊菌門の *Pezizomycotina* (チャワソウタケ亜門) に属し、残りの1%未満の種は担子菌門の *Agaricomycetes* (ハラタケ綱) に属する (Kirk *et al.* 2008)。子囊菌類には、木材や植物遺体、動物や昆虫の糞などを分解する腐生菌と、動物や植物、他の真菌類から栄養を奪う寄生菌、そして植物などの光合成生物と栄養供給面等の関係を持つ共生菌が含まれる (Schoch *et al.* 2009a)。菌界で最大の分類群である子囊菌門の1/4以上、すなわち1万9000種以上が地衣化するが (Lücking *et al.* 2016)、地衣化子囊菌の種多様性と比較して共生藻は約120種と、驚くほど少ない (Honegger 2012)。地衣化するシアノバクテリアはいくつかの目に属する15属が知られている (Kirk *et al.* 2008)。Nostocales に属する *Nostoc* 属など、地衣化するシアノバクテリアのほとんどがヘテロシストを形成し窒素固定を行い、共生菌にアンモニアを供給する (Rai 2002)。地衣化する緑藻は25属が知られ、そのほとんどは *Trebouxiophyceae* (トレボウクシア藻綱) に属し、一部は *Ulvophyceae* (アオサ藻綱) の数属に属する (Kirk *et al.* 2008)。トレボウクシア藻綱に属する *Trebouxia* 属は最も普遍的な共生藻である (Honegger 2012)。

### 1.2 地衣共生における糖利用

多くの地衣体 (*lichen thallus*) の構造は、最も外側にあつて菌糸から成る皮層と、皮層内部にあり菌糸が緩く錯綜してできる髓層、髓層同様に皮層内部にあり共生藻が菌糸によって取り囲まれている藻類層から成る (吉村 1974)。この皮層内部の藻類層において、共生

藻は光合成を行う。地衣化する緑藻はポリオール的一种である糖アルコールを合成し、それが共生菌へ渡ることが分かっている。例えば、*Trebouxia*, *Myrmecia*, *Dictyochloropsis* および *Coccomyxa* 属ではリビトール, *Heterococcus*, *Hyalococcus*, *Stichococcus* および *Trochiscia* 属ではソルビトール, *Trentepohlia* および *Phycopeltis* 属ではエリスリトールが特異的に生産・放出される (Honegger 2012)。共生菌はそれらを取り込み、同じくポリオールに分類されるマンニトールやアラビトール、または二次代謝産物などに変換する (Richardson and Smith 1968a, Lewis and Smith 1967)。 *Trebouxia* 属を共生藻とする *Xanthoria calcicola* における  $^{13}\text{C}$ NMR のトレーサー実験により、D-xylulose 5-phosphate を中間産物とするペントースリン酸経路を介した、リビトールからマンニトールへの代謝経路が示されている (Lines *et al.* 1989, Fig. 1.1)。この結果、地衣類からは緑藻由来のポリオール (リビトール、ソルビトールまたはエリスリトール) と、共生菌由来のポリオール (マンニトールやアラビトール) が糖よりも高い濃度で検出される (Roser *et al.* 1992, da Silva *et al.* 1993, Gaio-Oliveira *et al.* 2005)。地衣体におけるポリオールは、適合溶質として乾燥耐性 (Cowan *et al.* 1979, Kranner *et al.* 2008) や凍結耐性 (Hájek *et al.* 2009a, Hájek *et al.* 2009b) に寄与し、また菌糸生長 (タンパク質やアミノ酸、多糖などの一次代謝産物合成) や二次代謝産物合成に利用されていると考えられている (Palmqvist 2008)。

### 1.3 ポリオールの特徴

地衣類から検出されるポリオールは全てその一分類である糖アルコールに属する。糖アルコールは、化学的にはアルドース (アルデヒド基を持つ単糖) やケトース (ケトン基を持つ単糖) が還元されて作られる。例えば、ソルビトール ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ) はグルコース ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )、マンニトール ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ; ソルビトールの異性体) はマンノース ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )、リビトール ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$ ; 別名、アドニトール) はリボース ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) の還元体である。マンニトールは植物においても普遍的に存在し (Patel and Williamson 2016)、ソルビトールはバラ科における主要な光合成産物であるが (Loescher *et al.* 1982)、リビトールは *Adonis vernalis* (フクジ

ユソウ属, Negm and Marlow 1985) と *Bupleurum* spp. (ミシマサイコ属, Olennikov and Partilkhayev 2013) を除き, 植物による合成は知られていない. 緑藻については, 地衣化する緑藻も属するトレボウクシア藻綱において, ポリオールの存在パターンが調べられており, バイオフィルムを形成し気生環境に生育する *Apatococcus* や *Elliptochloris*, *Watanabea* 属でもリビトールが保持してした (Gustavs *et al.* 2011). 最近になって, *Apatococcus* 属の一種である *A. fuscideae* は地衣化する緑藻であることが分かった (Zahradníková *et al.* 2017). それに対し, 同じくトレボウクシア藻綱に属するものの, 主に水生環境に生育する *Chlorella* 属はポリオールを含まなかった. すなわち, リビトールは地衣化する緑藻やその近縁種である気生藻類で特異的に生産されるポリオールと考えられる. ソルビトール, マンニトール, リビトールなどは, 非環状ポリオール, または単にポリオールと呼ばれることが多いため (Nash 2008, Honegger 2012), 本論文ではこれらをポリオールと呼ぶ.

#### 1.4 本研究の目的

以上より, 緑藻から供給される特定のポリオールは, 地衣化子嚢菌類において重要な炭素源かつエネルギー源であり, 地衣体の生長や環境適応に利用されている. したがって, 特定のポリオールの輸送および代謝機構は, 地衣化子嚢菌類にとって緑藻との共生に必須の機構であると考えられる. しかしながら, 最も多くの地衣類で利用されるリビトールを始め, 真菌類におけるポリオールの輸送および代謝の機構はほとんど明らかにされていない. これらの機構は, 共生関係を維持するための最重要機構と言えるにもかかわらず, 地衣類の共生現象における大きなミッシングリンクとなっている. そこで本研究では, 子嚢菌類において, 地衣化子嚢菌類がポリオールの輸送や代謝に関して優位性または独自性を有しているのではないかという仮説を立て, 子嚢菌類全体におけるポリオールの輸送や代謝を明らかにし, 地衣化現象との関連性を探った. はじめに第 2 章では, 地衣化子嚢菌 *Ramalina conduplicans* を分離し, 炭素源としてのポリオールの影響と最適な合成培地について検討した. 第 3 章では, 前章の実験より, ポリオールの輸送および代謝のモデル地衣

類として有用と考えられた地衣化子囊菌 *R. conduplicans* の全ゲノム *de novo* シーケンスを実施した。第 4 章では、前章で得られた *R. conduplicans* のゲノム情報とデータベース上のゲノム情報を利用し、子囊菌門におけるポリオール輸送体遺伝子の保存性を調べ、さらに地衣化現象との関係性について考察した。第 4 章の結果からポリオール輸送体遺伝子が地衣化子囊菌類のみならず、子囊菌門全体で高く保存されていることが示されたことから、第 5 章では、地衣化子囊菌および地衣体を住处とする内生菌（主に子囊菌類）を分離し、それらのポリオール資化性について比較した。第 6 章では、各章の結果を基に仮説に対する総合考察を行い、今後の課題を提示した。



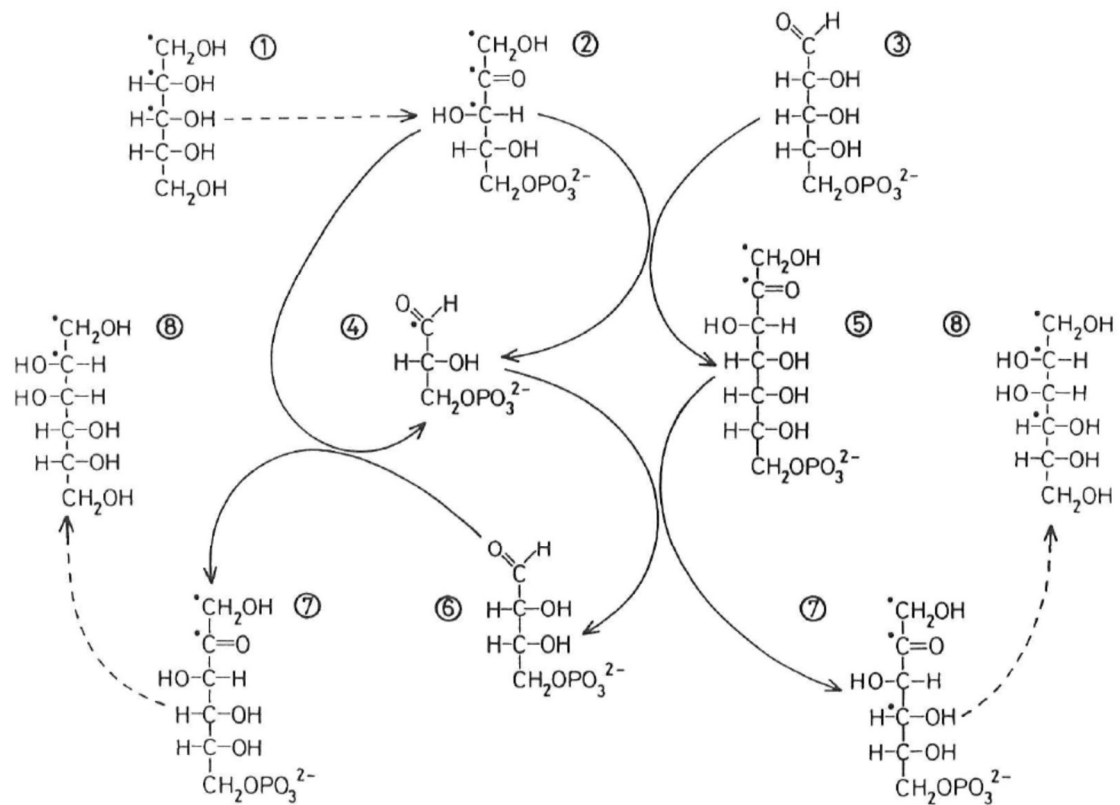


Fig. 1.1 The conversion of 1,2,3-labelled ribitol into mannitol via xylulose-5-phosphate and the pentose phosphate pathway showing the fate of the labelled carbon atoms. The labelled compounds are: 1, ribitol; 2, D-xylulose-5-phosphate; 3, D-ribose-5-phosphate; 4, D-glyceraldehyde-3-phosphate; 5, D-sedoheptulose-7-phosphate; 6, D-erythrose-4-phosphate, 7, D-fructose-6-phosphate; 8, mannitol. cited from Lines *et al.* 1989, Figure 7.

## 第2章 地衣化子囊菌 *Ramalina conduplicans* の培養に最適な合成培地の検討

### 2.1 目的

地衣類の約 88%の種は緑藻を共生藻としており (Honegger 2008), これら緑藻由来のポリオールを地衣化子囊菌類は炭素源やエネルギー源として利用する. *Trebouxia* 属や *Coccomyxa* 属など多くの共生藻はポリオールの中でもリビトールを生産する. 地衣類は多くの場合, 共生菌と共生藻を分離してそれぞれ培養することが可能であり (山本 2002), それによりそれぞれの生理機能や代謝産物が調べられてきた. 特にこれまでに 800 以上の二次代謝産物が地衣類から単離され, ウスニン酸をはじめとする (Ingólfssdóttir 2002) 多くが地衣類に特有である (Ranković and Kosanić 2015). これらは全て共生菌の代謝に由来し (Ranković and Kosanić 2015), 薬学・農学的な利用が検討されている. ただし, 担子菌類を共生菌とする場合 (Lumbsch 1998) や, シアノバクテリアを共生藻とする場合 (Galun and Shomer-Ilan 1988) は, 地衣類特有の二次代謝産物合成は知られていない. 一方, 地衣類は非常に生長が遅い菌類であることが知られ, 湿度や温度にも異なるが, 1 年間に 0.5–8 mm しか生長しない (Hale 1973). 自然状態での地衣類ほどではないが分離共生菌においても生長が遅く, *in vitro* における実験や産業応用への足かせになっていると考えられる. そのため, 菌糸生長と二次代謝産物の合成を促す培養条件の一つとして, ポリオールの添加による影響が調べられてきた. 例えば, *Usnea rubescens* から分離した共生菌の培養実験では, 麦芽・酵母エキス寒天培地にリビトールを添加することで 10 週目以降の菌糸生長が増加した (Yamamoto *et al.* 1985). また, *Ramalina farinacea* および *R. fastigiata* では, 麦芽・酵母エキス寒天培地を基本培地とした場合に, 1%リビトールの添加で 30%前後生長率が増加した (Wang *et al.* 2009). *Fulgensia bracteata* についても同様に麦芽・酵母エキス寒天培地を基本培地とした場合に, 0.05–2.0%リビトールの添加することで, グルコースやスクロースの添加では見られない菌糸生長の促進が見られた (Meeßen *et al.* 2013). また, *Cladonia rangiferina* では, 麦芽・酵母エキス寒天培地にリビトールを添加した時のみ,

もとの地衣類と同じ二次代謝産物である fumarprotocetraric acid を産生した (Elshobary *et al.* 2016). このように緑藻を共生藻とする地衣化子囊菌類では、ポリオールが生長・二次代謝産物合成に重要な役割を果たしていることが示されてきた.

*Ramalina conduplicans* は地衣化する 115 科の中で 4 番目に多くの種を含む子囊菌門チャシブゴケ綱チャシブゴケ目の Ramalinaceae に属し (Lücking *et al.* 2016), 最も普遍的な共生藻である *Trebouxia* 属と共生する (Honegger 2008). *Ramalina* 属は世界中に分布しており (Kirk *et al.* 2008), また, 共生藻と分離された共生菌が培地上で比較的早く生長することから (Komiya and Shibata 1971), 共生菌の二次代謝産物の化学構造の決定や生理活性についてなど, 多くの実験に用いられてきた (Moreira *et al.* 2015 の review に詳しい). 特に, *R. conduplicans* 由来の二次代謝産物には, 工業・薬学・農学的な利用が期待できる物質も含まれ (Oh *et al.* 2006, Wei *et al.* 2008, Vinayaka *et al.* 2009, Luo *et al.* 2010), それゆえ, *R. conduplicans* をモデル生物として利用していけば, 将来的な応用も期待できる. *R. conduplicans* を地衣類におけるポリオールの輸送および代謝を明らかにするためのモデル生物とするために, まずは最適な合成培地を検討する必要がある. そこで, これまで一般的に共生菌の培養に使用されてきた麦芽・酵母エキス培地を対照区として, 真菌類の培養に適用例のある 4 つの合成培地で分離共生菌を培養し, 生育および二次代謝産物を比較した. *Ramalina* 属はリビトールを合成・放出する *Trebouxia* 属を共生藻としているため (Komiya and Shibata 1971), *R. conduplicans* の本来の炭素源はリビトールであると考えられる. そこで合成培地に添加する炭素源はリビトールまたはスクロース (対照区) として, 同様に比較した.

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 試料の収集と形態観察による種同定

地衣類は 2014 年 7 月 15 日に青森県十和田湖畔 (40°26'N 140°55'E) で採集した. 標本

No. 14071501 (Fig. 2.1) について、吉村 (1974) を基に外部形態による種同定を行った。

## 2.2.2 組織培養法による地衣化子囊菌の分離

地衣体からの共生菌の分離培養は Yamamoto *et al.* (1985) の組織培養法に準じて行った。まず、地衣体から約 1 cm 長の小片をいくつかメスで切り出し、50 mL ビーカーに移し、ガーゼを被せて輪ゴムで固定した。ビーカーに水道水を流し約 30 分間洗浄した。ビーカーの水を除き、地衣体小片をクリーンベンチ上の加熱滅菌済み乳鉢に移し、滅菌水 3 mL を加え、乳棒で粉碎した。シャーレの上に 500  $\mu$ L の篩を重ね、破碎液をピペットで吸い上げ、500  $\mu$ L の篩でろ過した。別のシャーレの上に 150  $\mu$ L の篩を重ね、ろ液をさらにろ過した。150  $\mu$ L の篩の地衣体微小片をさらに滅菌水で洗浄した。実体顕微鏡下に地衣体微小片の乗った 150  $\mu$ L の篩を置き、竹串で地衣体微小片を拾い上げた。50 本程度の試験官に麦芽・酵母エキス寒天斜面培地 (MY 培地, 2%麦芽エキス, 0.2%酵母エキスおよび 2%寒天, Ahmadjian 1967) を用意し、地衣体微小片を植え付けた。麦芽エキス, 酵母エキスおよび寒天は全て Becton, Dickinson and Company 社製のものを使用した。明所, 19°C で数ヶ月間培養した。出現した菌を植え継いで株を確立した。

## 2.2.3 地衣体および培養菌体からのゲノム DNA 抽出および PCR

培養菌体からのゲノム DNA 抽出には NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel 社製) を使用し、キットのプロトコルに従った。地衣体からのゲノム DNA 抽出は、cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 溶液 [2% cetyltrimethylammonium bromide, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl] を用いた方法で行った。CTAB 溶液 700  $\mu$ L と地衣体を乳鉢に入れ粉碎し、1.5 mL チューブに移した。チューブはブロックヒーターで 65°C, 30 分間インキュベート後、フェノール・クロロホルム溶液 (phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 25: 24: 1) 750  $\mu$ L を加えた。チューブをボルテックスで攪拌し、遠心分離し (22,100  $\times$ g, 2 分間), 上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。等量の 2-プロパノールを加え、遠

心分離し (22,100×g, 2 分間), 上清を除去した. チューブに残った DNA ペレットを 70% エタノールで洗浄, 風乾し, TE バッファー [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)] 50 µL に溶解した. 抽出したゲノム DNA 溶液は, 核リボソーム DNA (nrDNA) 内の内部転写領域 (internal transcribed spacer (ITS) regions) および 5.8S nrDNA の増幅するための鋳型に用いた. PCR 反応液 (100 µL 当たり): 10 µL 10× Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus), 8 µL 2.5 mM dNTP mixture, 0.5 µL 5U µL<sup>-1</sup> TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa Bio), 2 µL 10 µM each primer, 2 µL ゲノム DNA 溶液および滅菌蒸留水を作製し, TaKaRa Ex Taq HS のプロトコルに従って, 加熱処理した. プライマーは ITS5 および ITS4 (White *et al.* 1990) を用いた. PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により確認した. PCR 産物 5 µL と 6×Loading Buffer 1 µL をパラフィルム上で混合し, 1.5%アガロースゲルのホールドに滴下した. 100 V の定電圧で 30 分間泳動した後, 0.5 mg L<sup>-1</sup> エチジウムブロマイド溶液中で 30 分間振とう染色を行い, トランスイルミネーターを用いて UV 照射しバンドを確認した.

#### 2.2.4 クローニングおよびシーケンシング

PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で精製し, pGEM-T Easy Vector System (Promega) のプロトコルに従ってクローニングした. クローニングした大腸菌より, アルカリ溶解法によりプラスミドを抽出した. 10 µL のサイクルシーケンス反応液: 0.5 µL Ready Reaction Mix (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 1.0 µL Big Dye sequencing buffer, 1.0 µL of 1.6-µM M13 each primer (forward: GTAAAA CGA CGG CCA GT or reverse: CAG GAA ACA GCT ATG AC), 150–300 ng プラスミドおよび蒸留水を作製し, 加熱処理: 96°C, 1 分間の後, 96°C, 10 秒間; 50°C, 5 秒間; 60°C, 4 分間のサイクルを 25 回繰り返した. エタノール沈殿により反応液から不要なプライマー等を除去し, 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンシングを行った. 得られた波長および塩基配列は BioEdit ver. 7.2.5 (Hall, 1999) で編集した. 地衣体および培養菌体から得られた ITS 領域および 5.8S rDNA の塩基配列は,

EMBOSS Needle (URL: <https://www.ebi.ac.uk/services>) でのグローバルアライメントにより比較した。

#### 2.2.5 合成培地の条件

ポジティブコントロールとして、MY 培地を使用した。その他の培地は合成培地であり、Bold's Basal Medium (BBM; Deason and Bold 1960, Bischoff and Bold 1963), Czapek-Dox medium (CD; Booth 1971), Lilly and Barnett's medium (LB; Lilly and Barnett 1951) および Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB; Becton, Dickinson and Company 社製) を基本培地として、これらの合成培地に炭素源として 2%のリビトールまたはスクロースを添加する区、または炭素源を含まない区の 3 試験区を設定した。BBM, CD および LB の組成は Table 2.1 から Table 2.3 に示した。また、MY 培地およびこれらの合成培地は、培地の pH を 5.5 に統一した。CD のみ pH 5.5 および 7.3 の培地を作製した。培地表面には全て、滅菌したセルロース膜を密着させた。

#### 2.2.6 菌体生長量および二次代謝産物の測定

MY 培地で培養した KY1401 株をピンセットで崩し取り、それぞれの培地に 5 反復で接種した。プレートにパラフィルムを巻き、19°C、光量子束密度が  $2.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  未満の光環境下で培養した。接種 0 週目から 3 週間毎に 12 週間、コロニーを実体顕微鏡の 10 倍率で撮影し、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) 上で面積 ( $\text{mm}^2$ ) を測定した。菌体生長面積は、それぞれの菌体の 0 週目のサイズを基準とした相対値を算出し、12 週目の値を基に Tukey-Kramer 法 ( $p < 0.01$ ) による多重比較検定を行った。培養 13 週間目に、炭素源を添加した区の培地からそれぞれランダムに 2 つの菌体を取り上げ、1.5 mL チューブにそれぞれ入れた。同様に KY1401 株を分離した標本 *R. conduplicans* 14071501 の一部も 2 つの 1.5 mL チューブに入れた。液体窒素でチューブごと凍結した後、凍結乾燥器で一晩凍結乾燥させた。凍結乾燥後の菌体をスクリー管瓶に移し菌体乾重量を測定した。培養 12 週

目における菌体生長面積の相対値と培養 13 週目における乾重量の間でピアソンの相関係数を求めた。2 mg の菌体乾重量に対して 100  $\mu$ L のアセトン（2 mg に満たない場合は 100  $\mu$ L のアセトン）を加え、3 時間抽出し、抽出液を高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）分析用のサンプルカップに 100  $\mu$ L 入れた。抽出液をフォトダイオードアレイ（Photodiode Array, PDA）検出器（SPD-M10A, 島津製作所製）付きの HPLC（Shimadzu LC-10AV, 島津製作所製）を使用し、以下の条件で測定した：カラム, YMC-PAck ODS-A S-5  $\mu$ m 150 x 4.6 mm I.D.; カラム温度, 40°C; 溶媒, CH<sub>3</sub>OH: H<sub>2</sub>O: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 80: 20: 1; 流量, 1 mL/min. 保持時間および 200 nm の波長を, 秋田県立大学の植物資源創成システムグループで構築されたデータベースと照合し, 化合物名を推定した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 採集した地衣類および分離培養株の同定

標本 No. 14071501 の外部形態を観察した結果, 地衣体は扁平であり, 擬盃点があり, 穿孔はなく, 地衣体内部は中実であったことから, *Ramalina conduplicans* Vain. であると同定した。標本 No. 14071501 から分離した菌株は KY1401 株とした (Fig. 2.2)。KY1401 株および標本 No. 14071501 から, それぞれ nrITS 領域および 5.8S nrDNA の塩基配列を取得し, GenBank に登録した (accession number: LC382022 および LC382023)。これらの類似性は 98.9%であったので, KY1401 株も *Ramalina conduplicans* であると同定した。また, 標本は千葉県立中央博物館へ登録番号: CBM-FL-204754 として寄贈し, 菌株は NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) へ寄託菌株番号: 113405 として寄託した。

### 2.3.2 菌体生長量

接種した菌体の 0 週目のサイズは 0.228–2.952 mm<sup>2</sup> であり, これらの値を基に菌体生長

面積の相対値を算出した。培養 12 週目における菌体生長面積の相対値と培養 13 週目における菌体乾重量の間では有意な正の相関があった（相関係数  $R = 0.95$ ）。培養 12 週目までの菌体生長面積の経時変化を Fig. 2.3 に示した。炭素源無添加区では、全ての培地において培養 12 週目までに 2 倍以下の生長量であったため、グラフからは省いた。最大の生長量を示したのはポジティブコントロールである MY 培地であり、約 44.0 倍生長した。次いで LB 培地にリビトールを添加した区で高くなり、約 37.6 倍生長した。また、MY 培地と LB 培地にリビトールを添加した区間で有意差はなかった。さらに、これらの培地においては 12 週目までに細胞増殖の定常期に達しなかった。LB 培地にスクロースを添加した区では約 15.8 倍生長したが、MY 培地と LB 培地にリビトールを添加した区との間では 1% 危険率で有意差があった。YNB 培地では、LB 培地にスクロースを添加した区と同程度に生長していた。BBM 培地および CD 培地では最大で約 7.0 倍生長した。

### 2.3.3 二次代謝産物

*R. conduplicans*（標本 No. 14071501）の 2 断片から共通して検出されたピークは、homosekikaic acid, sekikaic acid, usnic acid および 4'-O-methylnorhomosekikaic acid と推定された（Fig. 2.4A および Fig. 2.5）。培養菌体からは全ての試験区において、homosekikaic acid, sekikaic acid, usnic acid および 4'-O-methylnorhomosekikaic acid は検出されなかったが、標本および培養菌体の両方から保持時間 3.2 分に未知化合物（Comp. 1）のピークが検出された（Fig. 2.4B）。Comp. 1 は 204 nm に最大の吸収波長を持っており、rangiformic acid の最大吸収波長と一致した（Fig. 2.6）。Rangiformic acid は本実験と同条件下において、2.6 分に溶出され、204 nm に吸収波長を持つ。Comp. 1 は培地や炭素源の種類に関わらず、全ての培養条件下で検出されたが、培地や炭素源の種類に特異的な物質は検出されなかった。



## 2.4 考察

### 2.4.1 培地間での比較

MY 培地は共生菌の培養に適するとされ (Ahmadjian 1967), *Ramalina* 属の培養にも用いられてきた (Yamamoto *et al.* 1985, Takahagi *et al.* 2002, Cordeiro *et al.* 2004, Timsina *et al.* 2013). 本試験においても MY 培地は全ての試験区の中で最大の生長率を示した. また MY 培地と同程度の生長率であり, かつ合成培地の中で最大の生長率を示したのは, 2%リビトールを添加した LB 培地であった. LB 培地に次いで高い生長率を示したのは YNB 培地であった. この 2 つの培地は, ビタミンであるチアミンとビオチンを含んでいる点が共通していた. Fox (1966) は *Ramalina ecklonii* 共生菌の培養において, チアミンとビオチンの不在下では生長に著しい低下が見られたことを報告している. 同様に, KY1401 株の生長においてもチアミンとビオチンは有用な栄養素であったと考えられる. 一方, *Ramalina nervulosa* および *R. pacifica* では, LB 培地よりも BBM 培地で共生菌がより増殖したという報告や (Verma *et al.* 2012), *Ramalina* 属の 6 種間で適する培養条件が異なったという報告もあり (Cordeiro *et al.* 2004), *Ramalina* 属では種ごとに培地の選択が必要と思われる. 以上より, *R. conduplicans* KY1401 の菌糸生長には LB 培地が合成培地としては最も適すると考えられ, 今後 LB 培地を用いることで, 炭素源の違いによるポリオール輸送や代謝に関する遺伝子の発現についても比較できると考えられる.

### 2.4.2 炭素源の比較

KY1401 株は 12 週目において, LB 培地にリビトールを添加した培地でスクロースを添加した培地よりも約 2.3 倍増殖し, 1%危険率で有意差があった. *Usnea rubescens* や *U. diffracta* を LB 培地で培養した実験においても, 炭素源としてグルコースやスクロースを添加した培地よりもリビトールやマンニトールを添加した培地でより増殖したことが報告されている (Yamamoto *et al.* 1987). さらに, *Usnea rubescens* の組織培養株 (Yamamoto

*et al.* 1985) や *Ramalina farinacea*, *R. fastigiata* (Wang *et al.* 2009), *Fulgensia bracteata* (Meeßen *et al.* 2013) の共生菌においても、MY 培地へのリビトール添加による生長の促進が報告されている。自然の共生状態では、これらの共生菌には共生藻である緑藻からリビトールが供給される。したがって、KY1401 株を始め、リビトールを緑藻から供給される共生菌は、リビトールをより効率的に利用する機構を有していると考えられる。

#### 2.4.3 二次代謝産物の比較

*R. conduplicans* (標本 No. 14071501) の 2 断片から共通して検出された homosekikaic acid, sekikaic acid および usnic acid は、これまでも *R. conduplicans* の主要含有成分として知られている (Kumar *et al.* 2009, Luo *et al.* 2010)。これらの成分は細胞毒性、抗バクテリア、抗真菌、抗酸化作用を持つことが分かっている (Esimone and Adikwu 1999, Ingólfssdóttir 2002, Oh *et al.* 2006; Luo *et al.* 2010, Verma *et al.* 2012)。しかしながら本実験において、これらの成分は共生菌培養株から検出されなかった。*Ramalina* 属を用いた他の研究においては、MY 培地で培養した *R. peruviana* の共生菌から sakikaic acid などの 4 つの成分が検出されたり (Cordeiro *et al.* 2004)、BBM や LB、MY 培地で培養した *R. nervulosa* から Sekikaic acid とウスニン酸の生産が確認されたりしている (Verma *et al.* 2012)。また Oh *et al.* (2006) では、*R. conduplicans* の孢子分離株を MY 培地、18°C、暗所、5 ヶ月間培養後の菌糸は dark gray であり、その菌体由来の成分が植物病原菌に対する抗真菌作用を示したと報告している。本研究で用いた *R. conduplicans* KY1401 株は植え継ぐことなく半年以上培養してもピンク色であり、継代によっても色の変化は確認されていない。したがって、同種であっても株によって表現形質が異なることが推測され、もとの地衣類と同様の二次代謝産物を合成させるためには、新たに分離菌株を確立することも一つの方法と考えられる。一方、Comp. 1 は培地や炭素源、共生藻の有無に限らず標本および培養菌体のどちらからも検出され、さらに rangiformic acid など、多くの脂肪酸類と同じ 204 nm の吸収波長を有していた。これまでに *Ramalina usnea*, *R. celastri* (Sasaki *et al.* 2001), *R. lacera* (Hanus *et al.* 2008) および

*R. roesleri* の地衣体 (Sisodia *et al.* 2013) と *R. celastri* の共生菌 (Fazio *et al.* 2014) において、様々な脂肪酸類が検出されている。また、*Ramalina yasudae* とその培養菌体からは複数の共通する脂肪酸のピークが得られている (Yamamoto and Watanabe 1974)。このことは、*R. conduplicans* とその培養菌体から同一と考えられる脂肪酸が検出された本結果と一致し、KY1401 株では rangiformic acid のような脂肪酸が恒常的に生産されると考えられる。結論として、*R. conduplicans* KY1401 は唯一の炭素源としてリビトールおよびスクロースを利用でき、検討した合成培地の中では LB 培地で最もよく増殖し、二次代謝産物生産よりも菌糸生長などの一次代謝に炭素源やエネルギー源を利用していると考えられる。ゆえに、異なる炭素源を添加した LB 培地上で KY1401 株を培養し比較することで、リビトールなど、特定の炭素源の輸送体や初期代謝経路の解明に応用していけると考えられる。

なお、本章は Yoshino *et al.* (in press) に報告した。

#### 4.5 要約

*Ramalina conduplicans* 共生菌の培養に最適な合成培地を検討するため、麦芽・酵母エキス寒天培地および 4 つの合成培地 (Bold's Basal Medium, Czapek-Dox medium, Lilly and Barnett's medium (LB) および Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids) で共生菌 KY1401 株を培養し、生育および二次代謝産物を比較した。また 4 つの合成培地には、炭素源としてそれぞれリビトールまたはスクロースの添加区を設定した。その結果、リビトールを添加した LB 培地において、検討した合成培地の中で最大の生長率を示し、またスクロースを添加した LB 培地でも良好な生育が見られた。二次代謝産物については、共生菌を分離した標本と一致する脂肪酸類と推定される物質がすべての培養条件下で検出された。以上ことから、*Ramalina conduplicans* KY1401 の培養に最適な合成培地は LB 培地であると結論した。この培地を用いることにより、炭素源だけの違いを比較することが可能となり、共生菌におけるリビトールの輸送や代謝に関わる機構を明らかにする上で、有用と考えられる。

Table 2.1 Bold's Basal Medium (BBM)

NaNO <sub>3</sub> <sup>*1</sup>	250.00 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>*1</sup>	175.00 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>*1</sup>	100.00 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	75.00 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	25.00 mg
NaCl <sup>*1</sup>	25.00 mg
KOH <sup>*2</sup>	31.00 mg
EDTA-2Na <sup>*2</sup>	50.00 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*3</sup>	4.98 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>*3</sup>	11.42 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*4</sup>	8.82 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O <sup>*4</sup>	1.44 mg
MnO <sub>3</sub> <sup>*4</sup>	0.71 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O <sup>*4</sup>	1.57 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O <sup>*4</sup>	0.49 mg
Distilled water	1.00 L

\*1 Made 100x stocks for each nutrient

\*2 Made 1000x stock mixed both nutrients

\*3 Made 1000x stocks for each nutrient

\*4 Made 1000x stock mixed all nutrients

Table 2.2 Czapek-Dox Medium (CD)

NaNO <sub>3</sub> <sup>*1</sup>	2.00 g
KCl <sup>*1</sup>	0.50 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	0.50 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>*2</sup>	1.00 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>*3</sup>	1.00 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O <sup>*3</sup>	0.50 mg
Distilled water	1.00 L

\*1 Made 20x stock mixed all nutrients

\*2 Made 20x stock

\*3 Made 100x stock mixed both nutrients

Table 2.3 Lilly and Barnett's medium (LB)

Asparagine	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O <sup>*1</sup>	0.2 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 mg
Thiamine	0.1 mg
Biotin	5.0 µg
Distilled water	1.0 L

\*1 Used FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14 g in this study



Fig. 2.1 *Ramalina conduplicans* Vain. (Specimen ID: K. Yoshino 14071501)



Fig. 2.2 *Ramalina conduplicans* KY1401 cultured on Lilly and Barnett's medium containing ribitol for 12 weeks.

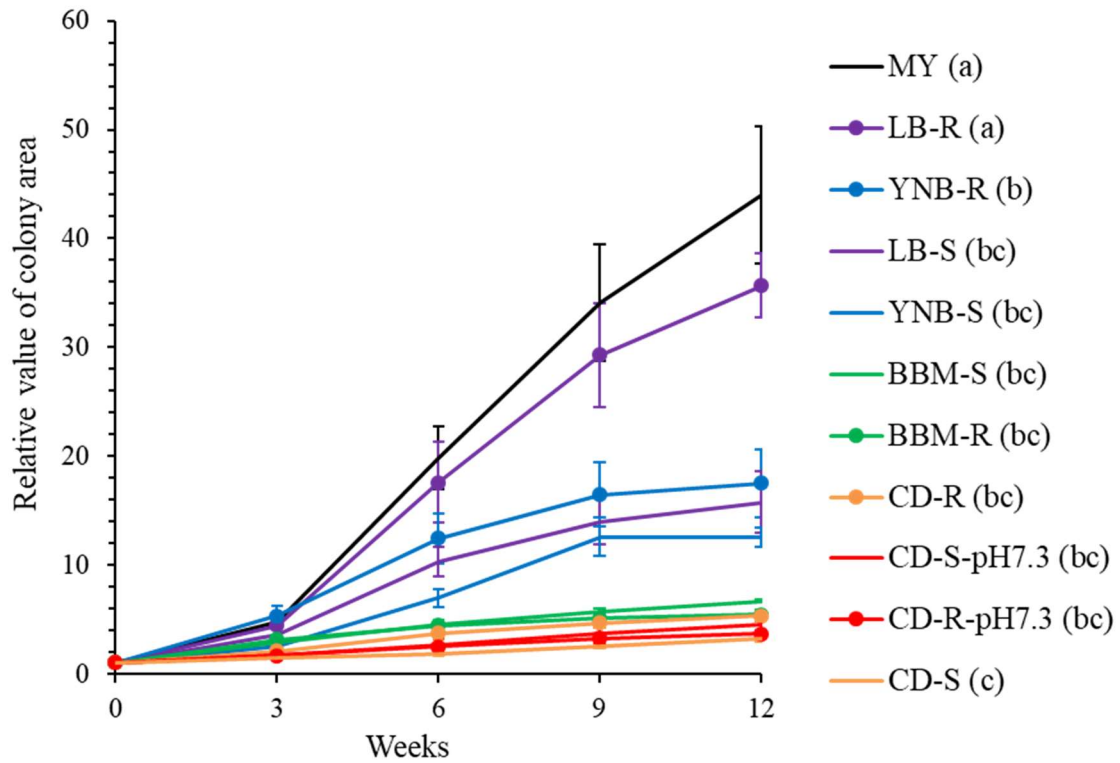


Fig. 2.3 Relative colony areas for *Ramalina conduplicans* KY1401 (n = 5) cultured on single plate of each medium for 12 weeks. Individual letters (a, b, and c) denote significant differences based on Tukey-Kramer test ( $p < 0.01$ ). Standard errors (n = 5) are shown on the graphs. Solid circles denote the media containing ribitol. Abbreviation: BBM = Bold's Basal Medium, CD = Czapek-Dox medium, LB = Lilly and Barnett's medium, MY = Malt and Yeast extracts medium, YNB = Difco Yeast Nitrogen Base medium without amino acids, R = ribitol, S = sucrose.

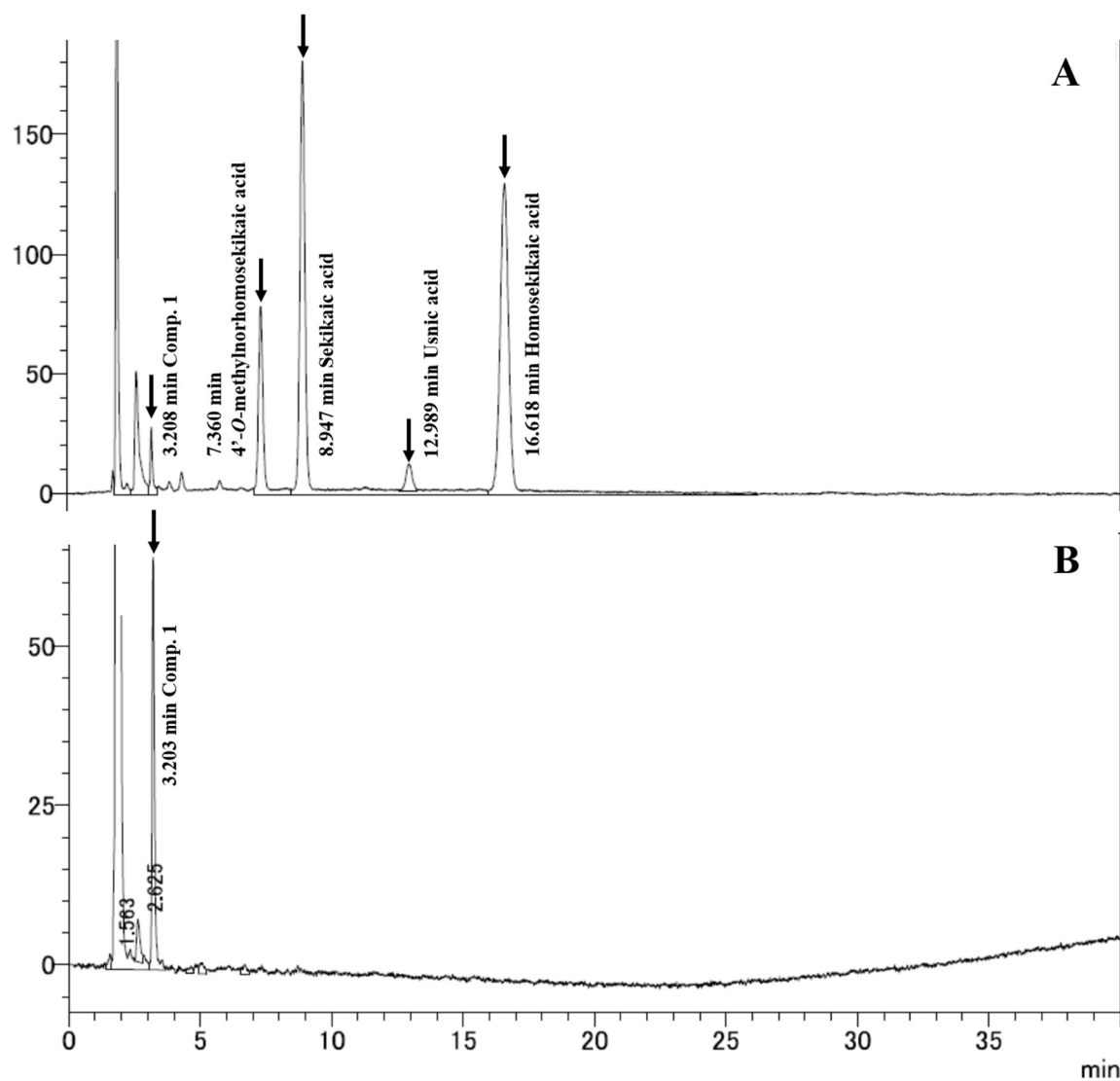


Fig. 2.4 HPLC chromatogram of acetone extract of *Ramalina conduplicans* (K. Yoshino 14071501) and the culture strain KY1401. (A) *R. conduplicans* (K. Yoshino 14071501) kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for approximately 2 years, (B) *R. conduplicans* KY1401 cultured on Lilly and Barnett's medium containing ribitol for 13 weeks.

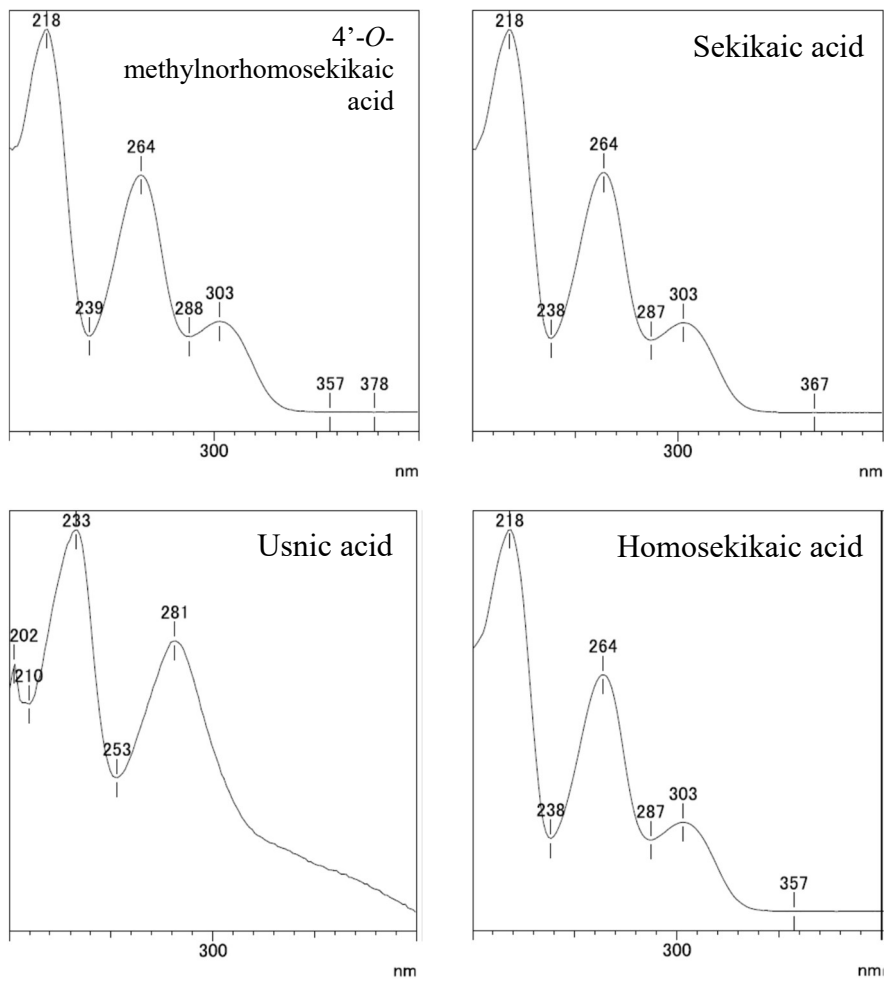


Fig. 2.5 UV spectra of the main four components in *Ramalina conduplicans* (K. Yoshino 14071501).

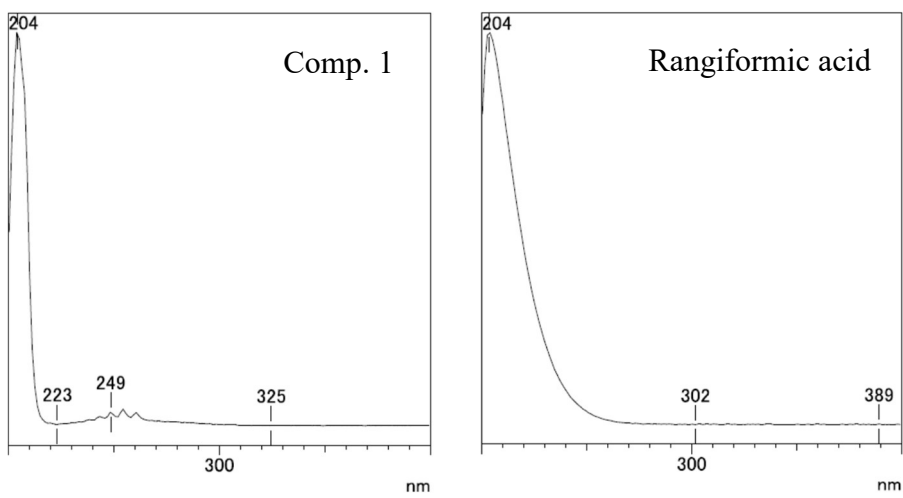


Fig. 2.6 UV spectra of Comp. 1 and rangiformic acid



### 第3章 地衣化子囊菌 *Ramalina conduplicans* の *de novo* ゲノムシーケンス

#### 3.1 目的

地衣化する子囊菌類は Arthoniomycetes, Coniocybomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomycetes および Lichinomycetes の7綱に属している (James *et al.* 2006, Schoch *et al.* 2009a, Lumbsch and Rikkinen 2017, Prieto *et al.* 2018). これまでに、この内の4綱に属する19種でゲノム配列情報が公開されている (Table 3.1). 特に、地衣化する菌類が属する最大の綱であり、95%以上の種が地衣化する Lecanoromycetes では (Miadlikowska *et al.* 2014), 16種の配列情報が登録されている. しかしながら、地衣化する子囊菌は1万9000種以上であることから、まだまだ地衣化子囊菌類のゲノム配列情報が十分であるとは言えない. 第2章において、*Trebouxia* 属を共生藻とする *Ramalina conduplicans* から共生菌 KY1401 株を分離し、この株が Lilly and Barnett's medium で良好な生育を示し、かつリビトールやスクロースを唯一の炭素源として増殖できることを示した. 今後、*R. conduplicans* KY1401 を地衣化子囊菌のポリオール輸送体や菌糸生長に係るポリオールの一次代謝を明らかにするためのモデルとしていくには、その基盤となるゲノムを明らかとすることが有用であると考えられる. しかしながら *R. conduplicans* を含め、Ramalinaceae ではこれまでに高精度のゲノム配列情報は報告されていない. そこで本章では、*R. conduplicans* KY1401 の *de novo* ゲノムシーケンスを実施し、高精度のゲノム情報を得ることを目的とした.

#### 3.2 材料および方法

##### 3.2.1 材料

第2章で得られた *Ramalina conduplicans* KY1401 株を以下の実験に供した. KY1401 株は麦芽・酵母エキス寒天培地 (MY 培地, 2%麦芽エキス, 0.2%酵母エキスおよび2%寒天) 上で、2014年より約4年間継代培養した. 麦芽エキス, 酵母エキスおよび寒天は全て Becton,

Dickinson and Company 社製のものを使用した。

### 3.2.2 ゲノム DNA の抽出

乾熱滅菌したピンセットを用いて、乾熱滅菌したアルミホイルに菌体を 1 サンプル当たり 50–200 mg (湿重量) 測り取った。乾熱滅菌した乳鉢および乳棒を常温まで放熱し、さらに冷凍庫内で冷やした後、乳鉢一杯に液体窒素を注ぎ入れ、乳鉢および乳棒をよく冷やした。液体窒素が半分ほどになったら、菌体を乳鉢にいれ、アルミホイルで菌体の飛散を防ぎながら、パウダー状になるまで菌体をよく磨り潰した。以下は NucleoSpin Plant II (MACHERY-NAGEL 社製) キットを用い、付属の User manual に一部改変を加えて行った。乾熱滅菌したマイクロスパテルを用い、パウダー状の菌体を 1.5 mL チューブに移した。乳鉢に Buffer PL1 200  $\mu$ L を加え、残った菌体も一緒に同じ 1.5 mL チューブに移した。さらに乳鉢に Buffer PL1 150  $\mu$ L を加えて、同じ 1.5 mL チューブに移す作業を 2 回繰り返した (Buffer PL1 は 1 サンプル当たり 500  $\mu$ L 使用した)。RNase A (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) 30  $\mu$ L を加え、しっかり混ざるまで転倒混和し、65°C、16 分間インキュベートした。なお、インキュベート中は 3 分毎に転倒混和した。CIA 溶液 200  $\mu$ L を加え、転倒混和し、室温、20,000 x g (14,300 rpm) で 15 分間遠心分離した。新しい 1.5 mL チューブに上清を移し、さらに CIA 溶液 200  $\mu$ L を加え、転倒混和し、室温、20,000 x g (14,300 rpm) で 15 分間遠心分離した。2 mL チューブに NucleoSpin Filter (violet ring) をセットし、遠心後の上清を移した。室温、11,000 x g (10,600 rpm) で 2 分間遠心分離し、NucleoSpin Filter (violet ring) を捨てた。Buffer PC 約 850  $\mu$ L を加え、転倒混和でしっかり混ぜた。コレクションチューブ (2 mL) に NucleoSpin Filter (green ring) をセットし、最大 600  $\mu$ L ずつ移し、室温、11,000 x g (10,600 rpm) で 1 分間遠心分離。ろ過液を捨てた。2 mL チューブからサンプルがなくなるまで繰り返した。Buffer PW1 400  $\mu$ L を加え、室温、11,000 x g (10,600 rpm) で 1 分間遠心分離し、ろ過液を捨てた。Buffer PW2 700  $\mu$ L を加え、室温、11,000 x g (10,600 rpm) で 1 分間遠心分離し、ろ過液を捨てた。さらに Buffer PW2 200  $\mu$ L を加え、室温、11,000 x g (10,600 rpm)

で2分間遠心分離し、カラムに Buffer が残っていないことを確認した。カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、65°Cに温めた Buffer PE (5 mM Tris-HCl, pH 8.5) 50  $\mu$ L を加え、65°C で5分間インキュベートし、室温、11,000 x g (10,600 rpm) で1分間遠心分離した。さらにこの作業を2回繰り返す、合計 150  $\mu$ L のゲノム DNA 抽出液を得た。ゲノム DNA 抽出液の濃度および純度を推定するために、電気泳動および吸光度の測定を行った。電気泳動には 1%アガロースゲルを用いた。DNA サイズマーカーとして、Loading Quick  $\lambda$ /Hind III (Toyobo 社製) を用い、65°C、5分間インキュベートした後、1  $\mu$ L (40 ng) および 2  $\mu$ L (80 ng) をそれぞれ 6 $\times$ Loading Buffer 1  $\mu$ L、TE Buffer 4  $\mu$ L とパラフィルム上で混合し、ゲルのホールドに滴下した。1  $\mu$ L ゲノム DNA 抽出液も同様に 6 $\times$ Loading Buffer 1  $\mu$ L、TE Buffer 4  $\mu$ L とパラフィルム上で混合し、ゲルのホールドに滴下した。100 V の定電圧で30分間泳動した後、0.5 mg L<sup>-1</sup> エチジウムブロマイド溶液中で30分間振とう染色を行い、トランスイルミネーターを用いて UV 照射しゲノム DNA の濃度および分解程度を確認した。なお、ゲノム DNA 抽出液サンプルは2つ作製し、分解程度などを確認した後、混合した。吸光度および簡易的な濃度の測定には NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。Buffer PE でブランク測定をした後、ゲノム DNA 抽出液 1  $\mu$ L を滴下し、吸光度および濃度を測定した。ゲノム DNA 抽出液は 4°C で保存した。

### 3.2.3 ライブラリ調整およびゲノムシーケンス

これ以降の作業はアプロサイエンス社を介して Macrogen Japan 社に委託した。まず初めにクオリティチェックを受けた。ライブラリ調整には SMRTbell Express Template preparation kit (Pacific Bioscience 社) を用いた。シーケンサーは PacBio Sequel System (Pacific Bioscience 社) を使用し、Sequel SMRT Cell 1M v2, Sequel Binding Kit 2.1 (Pacific Bioscience 社) を用いて 1 SMRT Cell のデータを得た。

### 3.2.4 *de novo* アセンブリ

The Sequel System software package に含まれる SMRT Link を介し、PacBio データ用 *de novo* アセンブリのパイプラインである HGAP (Hierarchical Genome Assembly Process) Assembly (v4.0) をデフォルトの設定で実行した。谷澤ら (2016) によると、HGAP 法のアセンブリ手順は、大まかには次のような流れで行われる：(1) 最も長いサブリード群をシード (リファレンス配列) として用い、(2) シードに短いサブリードをマップし、(3) エラー補正を行った *preassembled reads* を作成し、(4) それらを用いてアセンブリの本番を行う。また、PacBio データは、ランダムな位置でシーケンスエラーが起こるため、(2) で短いリードをマップして、ポジションごとに出現する塩基の多数決ルールを適用することでエラー補正ができるとあった。

### 3.2.5 アノテーション

ゲノム配列上のタンパク質をコードする遺伝子領域の予測は、Maker (v2.31.8) によって実行した。推定遺伝子の機能は、UniProt Swiss-Prot データベースを利用した Protein BLAST+ (v2.6.0) によって行った。配列相同性の指標の一つとして用いられる E-value は  $1e-3$  を上限値とした。

## 3.3 結果および考察

### 3.3.1 ゲノム DNA の品質チェック

抽出したゲノム DNA の吸光度および濃度は Table 3.2 に、電気泳動写真は Fig. 3.1 に示した。スメアが見られたため、クオリティチェックは Fail 判定となったが、メインバンドが明瞭であったため、そのままライブラリ調整に進んだ。

### 3.3.2 ゲノムシーケンス

*R. conduplicans* KY1401 のサブリード長の分布については Fig. 3.2 に示した。平均サブリード長は 8,564 bp, N50 サブリード長は 15,398 bp, 全塩基数は 9,173,301,256 bp, リード数は 1,071,048 であった。

### 3.3.3 他の地衣化子嚢菌ゲノムとの *de novo* アセンブリの比較

*R. conduplicans* KY1401 の N50 コンティグ長は 1,723,122 bp, 最大コンティグ長は 3,957,092 bp, 最小コンティグ長は 26,215 bp であった。これら以外にゲノムサイズ, カバレッジ数, コンティグ数および推定遺伝子数を評価するため, MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) および GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) でゲノム DNA 情報が公表されている地衣化子嚢菌と合わせて, Table 3.1 にまとめた。シーケンサーの種類は, 454 (Roche 社製), Solexa (Illumina 社製), さらに Solexa の後継者である MiSeq や HiSeq 2000 (共に Illumina 社製) などが使用されていた。これまでに読まれた Lecanoromycetes のゲノムサイズは 19.47–56.12 Mbp で, 平均値は 35.70 Mbp であった。したがって *R. conduplicans* KY1401 の 38.51 Mbp は想定内のゲノムサイズであった。カバレッジ数は各ゲノムシーケンスではばらつきが大きいが, HGAP の実行にはカバレッジ 100x 以上が推奨されているので (Utturkar *et al.* 2014), *R. conduplicans* KY1401 の 238x は HGAP を実行するのに十分であったと考えられる。コンティグ数はこれまでの地衣化子嚢菌ゲノムの中で最少の 39 本であった。これまでに読まれた Lecanoromycetes の推定遺伝子数の平均値は 10,331 個であり, *R. conduplicans* KY1401 の 11,199 個はおおよそ予想通りであった。

### 3.3.4 アノテーションの評価

BLAST 結果の概要について Fig. 3.3 に示した。推定遺伝子 11,199 個の内, 9280 個は

BLAST にヒットしたが、その多くが機能未知の遺伝子であった。また、212 個の遺伝子がトランスポーターとアノテーションされていたが、ポリオールトランスポーターとアノテーションされた遺伝子はなかった。最近になって子囊菌門のサッカロミセス亜門に属す 3 種の酵母において複数の遺伝子が同定されたが (Pereira *et al.* 2014, Londesborough *et al.* 2014, Jordan *et al.* 2016), ポリオール輸送体は糖輸送体とパラログであるために (Pereira *et al.* 2014, Jordan *et al.* 2016), 糖輸送体とアノテーションされているのではないかと考えられる。その他アノテーションされた遺伝子の中には, mannitol dehydrogenase, mannitol-1-phosphate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase-like, D-arabinitol dehydrogenase および L-arabinitol 4-dehydrogenase の 5 つのポリオール脱水素酵素遺伝子が存在した (Table 3.3)。これらの遺伝子は植物または真菌類由来の配列と類似性が高かった。これまでに, *Trichoderma reesei* (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes) の持つ L-arabinitol 4-dehydrogenase (accession no. AF355628.1) はリビトール脱水素酵素としても機能することが分かっており (Richard *et al.* 2001), *R. conduplicans* KY1401 のゲノム配列から推定された L-arabinitol 4-dehydrogenase についても, リビトールの代謝反応に関与すると期待される。今後, 得られたゲノム配列をリファレンスとしてトランスクリプトーム解析などを行うことで, 緑藻との共生に必須である地衣化子囊菌のリビトール関連遺伝子群を明らかにできると考えられる。

### 3.4 要約

*Ramalina conduplicans* KY1401 の *de novo* ゲノムシーケンスを実施し, これまでに公開されている地衣化子囊菌で最少の 39 本のコンティグからなる 38.51 Mbp のゲノム配列を得た。遺伝子数は 11,199 個と推定され, ポリオールの代謝酵素についてもいくつか候補が得られた。今後, リビトールの輸送や代謝に関わる遺伝子の全貌を明らかにするための基盤となる, 有用なゲノム情報が得られたと考えられる。

Table 3.1 Comparison of available genome sequences of lichen-forming fungi

Species and strains	Type of sequencer	Genome				References
		size (Mbp)	Coverage depth (x)	# of contigs	# of genes	
<b>Coniocybomycetes</b>						
<b>Coniocybales</b>						
<b>Coniocybaceae</b>						
<i>Sclerophora sanguinea</i> CBS100924 v1.0	(Illumina)	18.02	90	147	7,223	
<b>Dothideomycetes</b>						
<b>Trypetheliales</b>						
<b>Trypetheliaceae</b>						
<i>Trypethelium eluteriae</i> v1.0	Solexa (illumina)	32.16	142	747	11,858	
<b>Eurotiomycetes</b>						
<b>Verrucariales</b>						
<b>Verrucariaceae</b>						
<i>Endocarpon pusillum</i> Z07020	454 (Roche) and Solexa (illumina)	36.78	78	1,731	9,238	Wang <i>et al.</i> (2014)
<b>Lecanoromycetes</b>						
<b>Lecanorales</b>						
<b>Cladoniaceae</b>						
<i>Cetradonia linearis</i> BA2	NextSeq (Illumina)	19.47	55	2,962	N/A	Allen <i>et al.</i> (2018)
<i>Cladonia grayi</i> Cgr/DA2myc/ss v2.0	454 (Roche) and Solexa (illumina)	34.62	15	519	11,389	
<i>Cladonia macilenta</i> KoLRI003786	HiSeq 2000 (Illumina)	37.12	540	1310	7,322	Park <i>et al.</i> (2013a)
<i>Cladonia metacorallifera</i> KoLRI002260	HiSeq 2000 (Illumina)	36.68	1023	625	11,361	Park <i>et al.</i> (2014a)
<i>Cladonia uncialis</i> Normore 8774	MiSeq (Illumina)	32.85	43	2137	N/A	Abdel-Hameed <i>et al.</i> (2016)
<b>Parmeliaceae</b>						

<i>Evernia prunastri</i> FR SP7-11	MiSeq (Illumina)	40.35	410	579	10,992	Meiser <i>et al.</i> (2017)
<i>Pseudevernia furfuracea</i> AKPM 0122M	MiSeq and HiSeq (Illumina)	37.80	350	143	8,842	Meiser <i>et al.</i> (2017)
<i>Usnea florida</i> ATCC18376 v1.0	(Illumina)	44.32	88	1,774	12,649	
<b>Ramalinaceae</b>						
<b><i>Ramalina conduplicans</i></b> <b>KY1401 v1.0</b>	<b>Sequel System</b> <b>(PacBio)</b>	<b>38.51</b>	<b>238</b>	<b>39</b>	<b>11,199</b>	<b>in this study</b>
<i>Ramalina intermedia</i> YAF0013	MiSeq (Illumina)	23.25	2	209	N/A	
<i>Ramalina peruviana</i> YAF0012	MiSeq (Illumina)	26.99	2	1731	N/A	
<b>Peltigerales</b>						
<b>Lobariaceae</b>						
<i>Lobaria pulmonaria</i> Scotland v1.0	(Illumina)	56.12	146	2,271	15,607	
<b>Teloschistales</b>						
<b>Teloschistaceae</b>						
<i>Gyalolechia</i> <i>flavorubescens</i> KoLRI002931	HiSeq 2000 (Illumina)	34.47	541	189	9,695	Park <i>et al.</i> (2013b)
<i>Xanthoria parietina</i> 46-1- SA22 v1.1	454 (Roche) and Solexa (illumina)	31.90	44	302	11,065	
<b>Umbilicariales</b>						
<b>Umbilicariaceae</b>						
<i>Lasallia pustulata</i> v1	HiSeq2000 (Illumina)	39.23	80	5,331	8,268	Dal Grande <i>et al.</i> (2017)
<i>Umbilicaria hispanica</i> C0002	MiSeq and NextSeq 500 (Illumina)	41.21	160	3084	8,488	Dal Grande <i>et al.</i> (2018)
<i>Umbilicaria</i> <i>muehlenbergii</i> KoLRI No. LF000956	HiSeq2000 (Illumina)	34.81	663	297	8,294	Park <i>et al.</i> (2014b)



Table 3.2 Qualities of genomic DNA

KY1401	A260/A280	ng/ $\mu$ L	Total amount ( $\mu$ g)
Sample 1	1.84	78.0	11.5
Sample 2	1.84	85.7	12.6
Sample 1 & 2*	N/A	61.2	14.7

\*Reported by MacroGen

Table 3.3 Annotation of polyol dehydrogenases

Query ID	Query length	Subject length	Description	Accession	Identity (%)	Similarity (%)	E-value
GENE_0000 3994-RA	340	338	Probable NADP- dependent mannitol dehydrogenase [ <i>Quercus suber</i> ]	XP_02387892 1.1	75	88	3e-162
GENE_0000 5785-RA	388	388	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase [ <i>Diplocarpon rosae</i> ]	PBP24451.1	64	77	4e-175
GENE_0000 7120-RA	266	266	Mannitol dehydrogenase [ <i>Glonium stellatum</i> ]	OCL02598.1	81	90	1e-159
GENE_0000 6176-RA	297	386	Sorbitol dehydrogenase- like [ <i>Quercus suber</i> ]	XP_02388862 1.1	56	72	2e-113
GENE_0000 7697-RA	369	365	D-arabinitol dehydrogenase [ <i>Umbilicaria pustulata</i> ]	SLM34796.1	65	78	1e-166
GENE_0000 8291-RA	514	376	L-arabinitol 4- dehydrogenase [ <i>Moelleriella libera</i> RCEF 2490]	KZZ92066.1	62	75	0.0

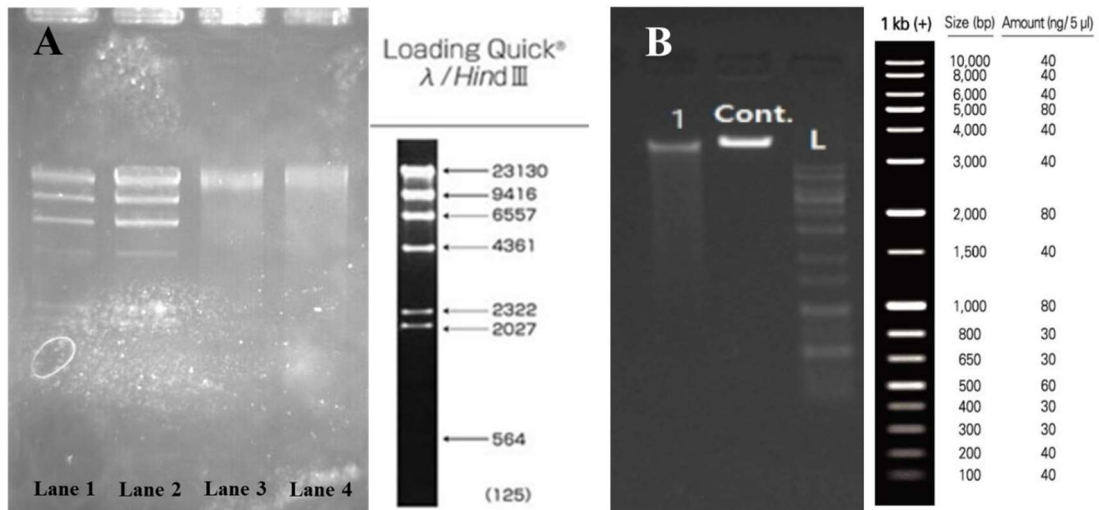


Fig. 3.1 Gel images of genomic DNA and DNA makers

A: Quality check of genomic DNA, Lane 1: Loading Quickλ/Hind III 40 ng, Lane 2: Loading Quickλ/Hind III 80 ng, Lane 3: sample 1, Lane 4: sample 2. B: Quality check of genomic DNA conducted by MacroGen. 0.5 μL of DNA was loaded.

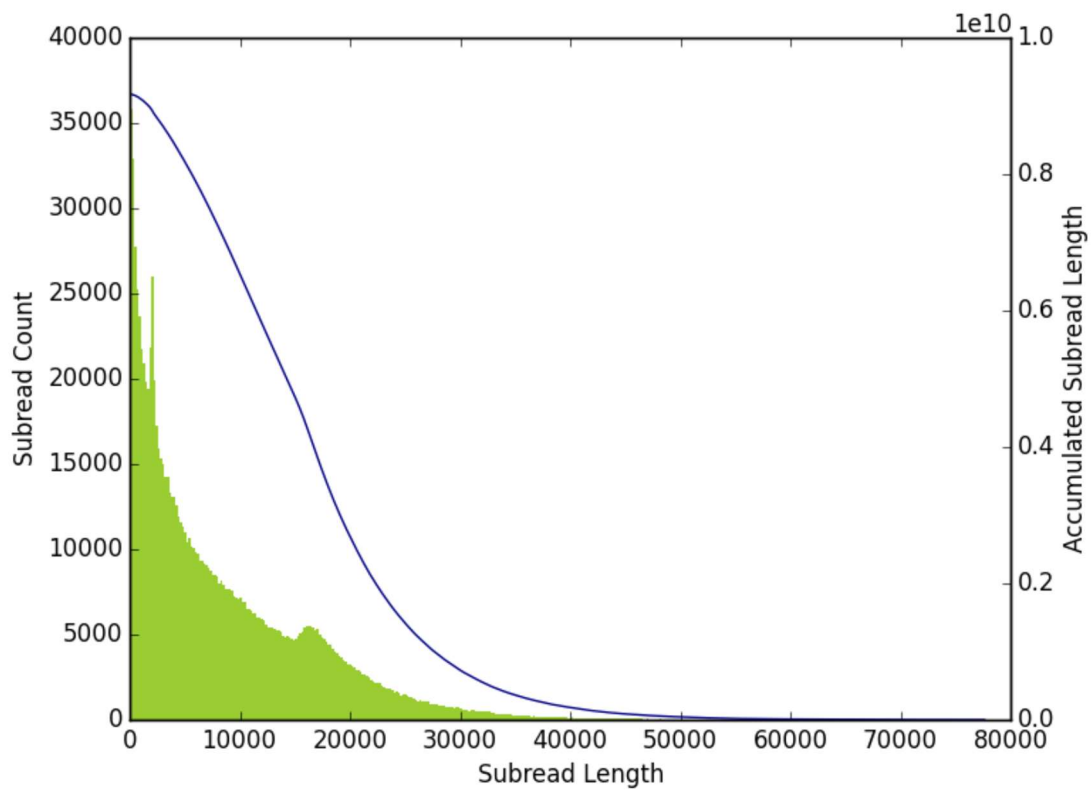


Fig. 3.2 Subread length distribution cited from Macrogen report

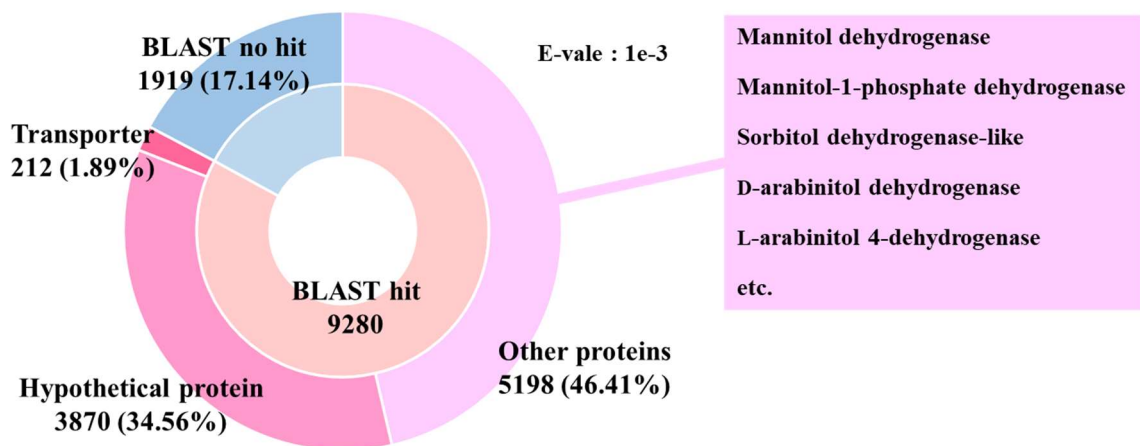


Fig. 3.3 Overview of BLAST results of estimated genes in *R. conduplicans* KY1401

## 第4章 ポリオール輸送体遺伝子候補の単離と分子系統学的解析

### 4.1 目的

地衣化現象，すなわち真菌が緑藻やシアノバクテリアを菌糸によって取り囲み，細胞外で密接（一部，陥入）しながら栄養供給面や環境適応などの利益を互いに得て共生する現象は，陸上生態系で最も普遍的に見られる共生現象の一つである．子囊菌類において地衣化現象は独立して14–23回起こったと試算されており（Lücking *et al.* 2016），その結果，子囊菌門の7綱をまたいだ1/4以上に当たる1万9000種以上が地衣類として生活している．例えば，Dothideomycetes および Eurotiomycetes には，主に非地衣化子囊菌類が属するが，Trypetheliales（Dothideomycetes）や Verrucariales（Eurotiomycetes）など，いくつかの目には地衣化子囊菌類が含まれる（Spatafora *et al.* 2006, Gueidan *et al.* 2007, Schoch *et al.* 2009b）．また Coniocybomycetes は Coniocybales（Prieto *et al.* 2013）の一綱からなり，属する子囊菌類は全て地衣化し，緑藻を共生藻とする（Rikkinen *et al.* 2016）．さらにこれまで地衣化子囊菌が見つかっていなかった Leotiomycetes においても Nostocaceae に属するシアノバクテリアと共生する種が報告された（Prieto *et al.* 2018）．したがって，地衣化現象を語らずして子囊菌類の進化を語ることはできず，この共生現象の解明が真菌類の多様化を説明する上で重要であることは間違いない．地衣化子囊菌類が7綱で1万9000種以上に分化する一方で（Lücking *et al.* 2016），共生藻となる緑藻は，Trebouxiophyceae に属する *Trebouxia* や *Asterochloris*, *Diplosphaera* 属などや，Ulvophyceae に属する *Trentepohlia* 属など，子囊菌類の多様性に比べると著しく限られた数属に集約される（Friedl and Büdel 2008）．これはすなわち，真菌類がこれら特定の光合成生物から大きな利益を得て進化してきたからであると考えられる．特に地衣化する真菌類の約85%が緑藻を，3–4%が緑藻およびシアノバクテリアの両者を共生藻としており（Honegger 2008），多くの地衣化子囊菌類が特定の緑藻を共有していることが分かる．

真菌類などの従属栄養生物は，自然界では他生物由来の炭素源なしでは生存・増殖でき

ない。よって、緑藻からの安定的な炭素源の供給は、子囊菌類が地衣化して得られる利益の一つであり、地衣類が世界中に分布し、また何億年も共生関係を維持してきた理由の一つでもあると考えられる。共生藻となる緑藻は、地衣化しているときにのみ、ポリオールであるリビトールやソルビトール、エリスリトールを細胞外へ放出する (Richardson *et al.* 1968)。例えばリビトールは、最も普遍的な共生藻である *Trebouxia* 属が放出するポリオールとして知られる (Honegger 2008)。特に、*Trebouxia* 属を共生藻とする *Xanthoria aureola* (Richardson and Smith, 1968a, 1968b) および *X. calcicola* (Lines *et al.* 1989) を用いた実験により、リビトールは共生菌の代謝系であるペントースリン酸経路を介して、マンニトールやアラビトールへと代謝されることが示されている。この他にも多くの地衣類でリビトールやマンニトール、アラビトールといったポリオールが検出されている (Lindberg *et al.* 1953, Lewis and Smith 1967)。それゆえ、ポリオールの輸送機構は緑藻を共生藻とする地衣化子囊菌にとって緑藻由来の炭素源を得るために必須であると考えられる。しかしながら、緑藻から子囊菌へのポリオールの輸送機構、特に輸送体はこれまでに明らかにされていない。

ポリオールは幅広い生物に存在し (Lewis and Smith 1967, Pfyffer and Rast 1980, Honegger *et al.* 1993, Gustavs *et al.* 2011)、活性酸素種の消去や (Parida and Das 2005)、適合溶質としての浸透圧調節や細胞機能の保護 (Wegmann 1986, Reed *et al.* 1987)、NADH または NADPH 由来のエネルギーの貯蓄 (Jennings 1985, Williamson *et al.* 2002) などが主な役割として知られている。ポリオール輸送体は、バクテリアや紅藻、植物、ヒトなどで見つかっている。バクテリアでは *Klebsiella pneumoniae* から D-アラビトール輸送体やリビトール輸送体 (Heuel *et al.* 1997)、紅藻では *Galdieria sulphuraria* で糖およびマンニトール輸送体 (Schilling and Oesterhelt 2007)、植物ではセロリにおけるマンニトール輸送体が初めて単離されたポリオール輸送体であり (Noiraud *et al.* 2001)、そしてヒトではグリセロールやマンニトール、ソルビトールなどを輸送できるチャネル (Tsukaguchi *et al.* 1999) がそれぞれ報告されている。真菌類では、子囊菌門の Saccharomycotina に属する酵母である *Debaryomyces hansenii*,

*Ambrosiozyma monospora* および *Saccharomyces cerevisiae* からそれぞれ, Syl1 および Syl2 (Pereira *et al.* 2014), Lat 1 および Lat2 (Londesborough *et al.* 2014), さらに Hxt11, 13, 15, 16 および 17 (Jordan *et al.* 2016) が, ポリオールの輸送能力を持つ輸送体または H<sup>+</sup>共輸送体として報告された. バクテリアや植物では, それぞれで初めに報告されたポリオール輸送体を基に, 同分類群から多くのオルソログが見つかった. したがって, 子囊菌酵母のポリオール輸送体を基に, 地衣化子囊菌類からもオルソログが見つかると考えられる. 一方, 子囊菌酵母のポリオール輸送体遺伝子と単糖輸送体遺伝子は, 配列の類似性からパラログであると考えられている. Palma *et al.* (2009) は 9 種の子囊菌酵母におけるヘキソース輸送体遺伝子の分子系統関係を明らかにしたが, 単糖輸送体とポリオール輸送体との進化的な関係性は明らかになっていない.

以上より本章では第一に, 子囊菌類におけるポリオール輸送体遺伝子の保存性と単糖輸送体遺伝子との関係性を分子系統学的に調べた. 地衣化子囊菌の情報を補完するために, 第 3 章において得られた *Ramalina conduplicans* のゲノムからも推定ポリオール輸送体遺伝子を選抜した. またこれとは別に, *Ramalina conduplicans* の mRNA 由来のポリオール輸送体遺伝子候補も単離した. 第二に, 子囊菌類で幅広く独立して複数回起こっている地衣化現象と, 緑藻との共生に必須と思われるポリオール輸送体遺伝子の保存性の関係について明らかにするため, 地衣化子囊菌類を含む子囊菌類の持つ推定ポリオール輸送体の数について評価し, 地衣化現象との関連性を考察した.

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 材料

第 2 章で得られた *Ramalina conduplicans* KY1401 を以下の実験に供した. KY1401 株は全 RNA 抽出のために, 炭素源にリビトールを添加した Czapek-Dox 培地 [3% ribitol, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O] を用い, 200 rpm,

19°C, 3ヶ月間振とう培養した。

#### 4.2.2 培養菌体からの全 RNA 抽出およびディジェネレート PCR

培養菌体からの全 RNA 抽出は, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を使用し, キットのプロトコルに従った。抽出液の濃度および A260/A280 比の測定には吸光度計, NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。20  $\mu$ L の逆転写反応液: 4  $\mu$ L 2.5 mM dNTP Mixture (TaKaRa Bio), 1  $\mu$ L Oligo(dT)15 Primer (Promega, Madison, WI, USA), 全 RNA (1  $\mu$ g), 4  $\mu$ L 5 $\times$  first-strand buffer, 1  $\mu$ L 100 mM dithiothreitol, 1  $\mu$ L SuperScript™ III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and RNase Inhibitor (Toyobo, Osaka, Japan) を作製し, 加熱反応: 25°C, 5 分間; 55°C, 60 分間; 70°C, 15 分間の処理により, 一本鎖 cDNA を合成した。ディジェネレートプライマーはポリオール輸送能力を持つ, *Debaryomyces hansenii* (*Dh*) の Syl1 および Syl2 と *Ambrosiozyma monospora* (*Am*) の Lat2 を基にそれぞれ作成した。AmLat2 からのディジェネレートプライマー作製には, 他の地衣化子囊菌類が持つ AmLat2 と類似性の高い配列も利用した。本実験で作成した全てのプライマーおよびその位置関係は, Fig. 4.1 に示した。ディジェネレート PCR 反応液 (100  $\mu$ L 当たり): 10  $\mu$ L 10 $\times$  Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus), 8  $\mu$ L 2.5 mM dNTP mixture, 0.5  $\mu$ L 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa Bio), 4  $\mu$ L 50  $\mu$ M each primer, 2  $\mu$ L cDNA および滅菌蒸留水を作製し, TaKaRa Ex Taq HS のプロトコルに従って, 加熱処理した。一回目のディジェネレート PCR 産物を 50 から 100 倍に蒸留水で希釈したものを鋳型として, nested PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。PCR 産物 5  $\mu$ L と 6 $\times$ Loading Buffer 1  $\mu$ L をパラフィルム上で混合し, アガロース 1%ゲルのホールドに滴下した。100 V の定電圧で 30 分間泳動した後, 0.5 mg L<sup>-1</sup> エチジウムブロマイド溶液中で 30 分間振とう染色を行い, トランスイルミネーターを用いて UV 照射しバンドを確認した。クローニングおよびシーケンシングは第 2 章 2.2.4 に準じて行った。

#### 4.2.3 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

3'末端の未知配列を得るため、全 RNA を鋳型として、cDNA cloning primer : GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TV (Integrated DNA Technologies) を用いて、逆転写反応を行った。PCR 反応液 (100  $\mu$ L 当たり) : 10  $\mu$ L 10 $\times$  Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus), 8  $\mu$ L 2.5 mM dNTP mixture, 0.5  $\mu$ L 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa Bio), 2  $\mu$ L 10  $\mu$ M primer (片側のプライマーは 3' RACE PCR : GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)), 2  $\mu$ L 一本鎖 cDNA および蒸留水を作製し、TaKaRa Ex Taq HS のプロトコルに従って、加熱処理した。一回目の PCR 産物を 50 から 100 倍に蒸留水で希釈したものを鋳型として、nested PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。5'末端の未知配列を得るため、5'末端がリン酸化された特異的プライマーを用いて逆転写反応を行った。反応液を T<sub>4</sub> RNA ligase (New England Biolabs, Tokyo, Japan) によって処理した。ライゲーション反応液を鋳型とし、PCR および nested PCR を行った。得られた PCR 産物を第 2 章 2.2.4 に準じて処理し、塩基配列を得た。GENETYX ver. 12. (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan) を利用し、得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。子囊菌酵母のポリオール輸送体および *R. conduplicans* KY1401 株から得られた推定ポリオール輸送体アミノ酸配列は、EMBOSS Needle (URL: <https://www.ebi.ac.uk/services>) を利用したグローバルアライメントにより比較した。

#### 4.2.4 アミノ酸配列の取得

ポリオールまたは単糖の輸送活性が明らかとなっている子囊菌類における輸送体のアミノ酸配列を GenBank (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より取得した。分子系統樹の作製には遺伝子がオルソログであることが前提となっているため、子囊菌酵母のポリオール輸送体である *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) の Hxt15, DhSyl1 および AmLat2 とそれらを含むポリオールまたは単糖輸送体との間で類似性を算出した。類似性の産出には EMBOSS Needle のグローバルアライメントを利用し、ScHxt15, DhSyl1 および AmLat2 の



いずれかと一つでも類似性が 30%未満の遺伝子については、分子系統解析から除外した。それぞれの輸送体タンパク質が輸送するポリオールまたは単糖の種類について、Table 4.1 に示した。次に、NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の Position-Specific Iterated-BLAST (PSI-BLAST) 検索により、Taphrinomycotina および Pezizomycotina の 6 綱 (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Orbiliomycetes, Pezizomycetes および Sordariomycetes) のそれぞれから ScHxt15, DhSyl1, DhSyl2 および AmLat2 と最も類似性の高いアミノ酸配列をそれぞれ選抜した (Table 4.2)。また、MycCosm, a fungal genomics resource (URL: <https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>; Grigoriev *et al.* 2011, 2014) の BLASTP 検索により Xylonomycetes と地衣化子囊菌類の *Sclerophora sanguinea* (Coniocybomycetes), *Trypethelium eluteriae* (Dothideomycetes) および *Endocarpon pusillum* (Eurotiomycetes) のそれぞれからも同様に ScHxt15, DhSyl1, DhSyl2 および AmLat2 と最も類似性の高いアミノ酸配列をそれぞれ選抜した。*Lasallia pustulata* (Lecanoromycetes, GenBank accession no. GCA\_900169345.1) および第 3 章において取得した *R. conduplicans* KY1401 のゲノムから Augustus ver. 3.3.2 (<http://augustus.gobics.de/>) プログラムによって改めて遺伝子予測を行い、local BLASTP ver. 2.7.1+プログラムで DhSyl1 および AmLat2 と類似する複数のアミノ酸配列を選抜した。同様に Lecanoromycetes に属する地衣類である *Cladonia grayi*, *Lobria pulmonaria*, *Usnea florida* および *Xanthoria parietina* から複数のポリオール輸送体候補を MycoCosm の BLASTP 検索により選抜した。これらポリオール輸送体の選抜に利用した地衣化子囊菌類は全てポリオールを放出することが知られている緑藻を共生藻としている。選抜したポリオール輸送体候補のアミノ酸配列は、InterProScan (URL: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) によるタンパク質ドメインの確認や MEMSAT3 および MEMSAT-SVM (URL: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1>, Jones 2007, Nugent and Jones 2009) による膜貫通領域の推定を行った (Table 4.2)。AmLat1 はポリオールの輸送活性が低い上、非飽和性輸送を示したため (Londesborough *et al.* 2014), また ScHxt11, 13, 16 および 17 は ScHxt15 とアミノ酸配列がほとんど一致しているため (Jordan *et al.*

2016), BLAST のクエリとしては用いなかった。

#### 4.2.5 アライメントおよび系統解析

前節で得た 143 のアミノ酸配列を用い, MEGA ver. 7 (Kumar *et al.* 2016) に実装されている MUSCLE によりアライメントした。保存性の低い配列は, phylogeny.fr (URL: <http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>; Dereeper *et al.* 2008) の Gblocks 0.91b (Castresana 2000) で除去した。系統解析に用いた最終的なアライメントは TreeBASE に登録した (Accession URL: <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S23762>)。得られたアライメントから MEGA を用い, 最尤法 (maximum-likelihood (ML) method) によるアミノ酸置換モデルを選択した。選択された LG (Le and Gascuel 2008) +F (empirical frequencies) +G (discrete Gamma distribution) (Yang 1994) +I (a proportion of invariant sites) モデルを用い, 最尤法による系統解析を raxmlGUI ver. 1.31 (Silvestro and Michalak 2012) で行い, また tree-bisection-regrafting algorithm (Nei and Kumar 2000) を用いた最大節約法 (maximum-parsimony method) でも系統解析を行った。また, 分岐の信頼性を評価するために, それぞれの系統解析においてブートストラップテストを 1000 回行った。

#### 4.2.6 各ゲノムにおけるポリオール輸送体タンパク質の数

MycCosm に登録されている 470 のゲノムセットと 2 種の地衣化子嚢菌類 (*R. conduplicans* 並びに *L. pustulata*) を用い, 既報のポリオール輸送体である *AmLat2* および *DhSyl1* と類似するタンパク質数をそれぞれのゲノムにおいて求めた。これらのポリオール輸送体と類似するタンパク質とする基準は, BLOSUM (BLOcks SUBstitution Matrix) 62 matrix (Henikoff and Henikoff 1992) に基づいて算出された値が 1,000 以上の場合とした。*DhSyl1* と *DhSyl2* は共にポリオール輸送体であるが, タンパク質類似性が 90%であり (Pereira *et al.* 2014), 予備試験による計算でほぼ同様の結果を示したため, *DhSyl1* のみ使用した。

## 4.3 結果および考察

### 4.3.1 ポリオール輸送体遺伝子候補の解析

ディジェネレート PCR および RACE 法によって KY1401 株から単離したポリオール輸送体遺伝子候補は、それぞれ *Ramalina conduplicans* (*Rc*) *Syl1* (accession number: LC375944) および *RcLat2* (accession number: LC375945) とした。これらのアミノ酸配列と、ディジェネレートプライマーの作製に用いた子囊菌酵母のポリオール輸送体アミノ酸配列とのアライメントを Fig 4.2 および Fig. 4.3, 類似性を Table 4.3 に示した。全てにおいて 60%強の類似性があった。また、KY1401 株のゲノムからは *RcSyl1* および *RcLat2* を含む 8 個のポリオール輸送体候補を選抜した (Table 4.2)。さらに Taphrinomycotina および地衣化子囊菌類を含む Pezizomycotina から選抜した 83 個のポリオール輸送体候補は、全て sugar/inositol transporter (IPR003663) protein family に属し、10–12 個の膜貫通領域を持つと推定された。既報の単糖またはポリオール輸送体の膜貫通領域は多くが 10–12 個であるため、選抜したポリオール輸送体候補は典型的な膜貫通領域数を持つと考えられた。しかしながら、アミノ酸配列長には、508 から 2,207 の幅があった (Table 4.2)。これは、保存性の低い C 末端または N 末端や膜貫通領域 6 と 7 個目の間でみられる親水性アミノ酸残基からなる領域の長さが異なることによると考えられる。また選抜された候補は、“putative polyol transporter 1”とアノテーションされていた *Neolecta irregularis* (OLL27129.1) を除き、推定単糖輸送体や推定タンパク質のアノテーションされていた。

### 4.3.2 子囊菌類におけるポリオール輸送体遺伝子の分子系統学的解析

12 個のポリオール輸送体、43 個の単糖輸送体、5 個のイノシトール輸送体 (Table 4.1) および 83 個のポリオール輸送体候補 (Table 4.2) を用いた最尤法による分子系統樹を Fig. 4.4 に示した。分子系統樹では、子囊菌酵母に由来するポリオール輸送体と様々な子囊菌に

由来するポリオール輸送体遺伝子候補からなる、最尤法および最大節約法によって高く支持された 3 つのクレードが存在した。このクレードには単糖輸送体は含まれなかったが、ポリオール輸送体クレード III は単糖輸送体のクレードと姉妹系統を成した。また、*Ambrosiozyma monospora* (*Am*) の Lat1 や *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) の Hxt11 などポリオールと単糖の両方を輸送するタンパク質も 3 つのポリオール輸送体クレードには含まれなかった。このことは、輸送される物質が数アミノ酸の違いに依るものであることを示唆する。ポリオール輸送体クレード II はグリセロール輸送体 (*ScSTL1*, *Debaryomyces hansenii* (*Dh*) の Stl1 および *Candida albicans* の STL1) と姉妹系統を成し、これは数個のアミノ酸の置換によって輸送されるポリオールの種類も変化することを示唆する。*S. cerevisiae* のポリオール輸送体は同種の単糖輸送体と姉妹系統となっていた。また ScHxt15 をクエリとして選抜した他の子囊菌類のポリオール輸送体候補は、*S. cerevisiae* のポリオール輸送体が形成するクレードには属さなかった。このことから、Hxt ファミリーは *S. cerevisiae* で主に進化した遺伝子であると考えられる。

Fig. 4.4 で示したポリオール輸送体クレード II および III は全ての 3 亜門かつチャワントケ亜門の 8 または 9 綱から選抜されたポリオール輸送体候補を含んだ (Fig. 4.5A および B)。すなわち、*DhSyl1*, *DhSyl2* および *AmLat2* に類似するタンパク質は地衣化現象に関係なく子囊菌類に広く保存されていることが分かった。これにより、複数のポリオール輸送体の子囊菌類の共通祖先種で既に保持され、これらのクレードに属す遺伝子は共通祖先種に由来するアウトパラログである可能性が考えられる。また、クレード II および III で示された子囊菌類におけるポリオール輸送体の高い保存性は、地衣化現象への過程を助け、地衣化現象の必要条件となっていた可能性も示す。つまり、ポリオール輸送体を保持していたことで、緑藻由来の炭素源を利用することができ、地衣化現象が子囊菌類で何度も起こり得たのではないかと思われる。また本研究において、*Saccharomycotina* に属する子囊菌酵母のポリオール輸送体から作製したディジェネレートプライマーは、異なる亜門に属する *R. conduplicans* において適用できたことから、幅広い子囊菌類において適用できると

考えられる。

### 4.3.3 ポリオール輸送体タンパク質数の比較

系統解析において、Lecanoromycetes に属する地衣化子囊菌類のゲノムからは、*DhSyl1* および *AmLat2* に類似するタンパク質を複数選抜して用いた (Table 4.2)。その結果、各種のゲノムから選ばれた、おおよそ 1,000 以上の BLOSUM-62 matrix スコアを持つ複数のタンパク質が Fig. 4.4 におけるポリオール輸送体クレード II および III にそれぞれ属した (ポリオール輸送体クレード II および III の詳細は Fig. 4.5A および B)。これにより Lecanoromycetes に属する地衣化子囊菌類のゲノムは、*DhSyl1* および *AmLat2* に類似するタンパク質をそれぞれ複数持つことが分かった。この結果を受け、この現象が Lecanoromycetes に特有のものであるかどうかを明らかにするため、Saccharomycotina に属する 45 種 46 株、Taphrinomycotina に属する 9 種および Pezizomycotina に属する 417 種のゲノム情報を用い、各ゲノムにおけるポリオール輸送体タンパク質の候補数を求めた (Fig. 4.6)。*DhSyl1* に類似するタンパク質数は各子囊菌においては、0 から 11 個まで存在したが、多くが 6 個以下であり、地衣化子囊菌類についても 2 から 6 個であった。しかしながら、*AmLat2* に類似するタンパク質数は最大で 3 個であり、87.5%の種が 0 または 1 個であった。*AmLat2* に類似するタンパク質を一個しか持たない種には、地衣化子囊菌類である *Endocarpon pusillum* (Eurotiomycetes)、*Sclerophora sanguinea* (Coniocybomycetes)、*Trypethelium eluteriae* (Dothideomycetes) および *L. pustulata* (Lecanoromycetes) が含まれた。一方、残りの Lecanoromycetes に属する地衣化子囊菌類 5 種のゲノムからは 2 個または 3 個の *AmLat2* に類似するタンパク質が見つかった。Wang *et al.* (2014) は *Endocarpon pusillum* でグルコースやフルクトースなどの多くの糖輸送体遺伝子が減少していることを報告していたが、今回、Lecanoromycetes に属するほとんどの地衣化子囊菌類では、少なくとも一つのポリオール輸送体において特異的に遺伝子が増加していることが示された。ポリオールは活性酸素種の除去 (Parida and Das 2005) や適合溶質として機能すること (Wegmann

1986, Reed *et al.* 1987) から、子囊菌類がポリオール輸送体候補を保持していることは理解できる。しかしながら地衣化子囊菌類ではポリオールを主要な炭素源として利用しており (Lines *et al.* 1989), それゆえ、ポリオール輸送体のより安定的な保持を必要としていると考えられる。特に Lecanoromycetes は最も長い緑藻との共生期間を経ていることもポリオール輸送体の増加に関わっているのかもしれない。遺伝子重複に由来する複数のタンパク質には、機能の多様化や効率的な転写などが期待できる。したがって、Lecanoromycetes に属する地衣化子囊菌類では、*AmLat2* に類似するタンパク質を拡大させることで、緑藻からの特異的なポリオールを効率的に利用している可能性が考えられる。

なお、本章は Yoshino *et al.* (2019) に報告した。

#### 4.4 要約

緑藻との共生に必須と考えられるポリオール輸送体について、近年明らかになった子囊菌酵母のポリオール輸送体を基に、子囊菌類全体におけるポリオール輸送体の保存性と地衣化現象との関連性を調べた。ポリオール輸送体は単糖輸送体のパラログであるが、系統解析で別のクレードを形成し、単糖輸送体と区別できることが分かった。このポリオール輸送体のクレードには子囊菌類から幅広く選抜されたポリオール輸送体候補が含まれ、地衣化するしないに関わらず子囊菌類にはポリオール輸送体が高く保存されていることが示唆された。一方で、Lecanoromycetes に属する地衣化子囊菌類の多くはリビトールおよび L-アラビトールの輸送能力を持つ *Ambrosiozyma monospora* の *Lat2* に類似するタンパク質を特異的に複数保持している可能性が示され、ポリオールの効率的利用や緑藻との共生関係の強化に役立っているのではないかと考えられる。

Table 4.1 Characterized polyol and monosaccharide transporters used for the phylogenetic analysis

Species	Protein		GenBank	Reference
	name	Transportable substances <sup>a</sup>		
<b>Saccharomycotina</b>				
<i>Ambrosiozyma monospora</i>	Lat1	L-arabinose, <b>ribitol</b> , <b>L-arabitol</b>	AAX98667.1	Verho <i>et al.</i> 2011, Londesborough <i>et al.</i> 2014
	Lat2	L-arabinose, <b>ribitol</b> , <b>L-arabitol</b>	AAX98668.1	Verho <i>et al.</i> 2011, Londesborough <i>et al.</i> 2014
<i>Candida albicans</i>	Hgt1	glucose	CAA76406.1	Varma <i>et al.</i> 2000
	STL1	<b>glycerol</b>	CAY08065.1	Kayingo <i>et al.</i> 2009
<i>Candida intermedia</i>	GXF1	glucose, xylose	CAI77652.1	Leandro <i>et al.</i> 2006
	GXS1	glucose, xylose	CAI44932.1	Leandro <i>et al.</i> 2006
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Sgl1	<b>galactitol</b>	CAG88649.2	Pereira <i>et al.</i> 2014
	Stl1	<b>glycerol</b>	CAG87598.2	Pereira <i>et al.</i> 2014
	Syi1	D-(+)- <i>chiro</i> -inositol	CAG90290.2	Pereira <i>et al.</i> 2014
	Syl1	<b>sorbitol</b> , <b>mannitol</b> , <b>ribitol</b> , <b>arabitol</b> , <b>galactitol</b>	CAR65543.1	Pereira <i>et al.</i> 2014
	Syl2	<b>sorbitol</b> , <b>mannitol</b> , <b>ribitol</b> , <b>arabitol</b>	CAG86001.1	Pereira <i>et al.</i> 2014
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Frt1	fructose	CAC79614.1	Diezemann and Boles 2003
	Hgt1	glucose	AAC49461.1	Billard <i>et al.</i> 1996
	Kht1	glucose	P18631.1	Milkowski <i>et al.</i> 2001
	Kht2	glucose	CAA87389.1	Milkowski <i>et al.</i> 2001
	Rag1	glucose	CAA37781.1	Wésolowski-Louvel <i>et al.</i> 1992
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gal2	galactose, glucose	NP_013182.1	Nishizawa <i>et al.</i> 1995
	Hxt1	glucose, fructose	NP_011962.1	Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt2	glucose, fructose	NP_013724.1	Kruckeberg and Bisson 1990, Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt3	glucose, fructose	NP_010632.1	Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt4	glucose, fructose	NP_011960.2	Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt5	glucose, fructose, mannose	NP_011964.1	Diderich <i>et al.</i> 2001
	Hxt6	glucose, fructose	NP_010630.1	Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt7	glucose, fructose	NP_010629.3	Reifenberger <i>et al.</i> 1997
	Hxt11	glucose, fructose, mannose, galactose, xylose, <b>xylitol</b>	NP_014486.1	Jordan <i>et al.</i> 2016

	Hxt13	<b>sorbitol, mannitol</b>	NP_010845.1	Jordan <i>et al.</i> 2016
	Hxt15	<b>sorbitol, mannitol, xylitol</b>	NP_010036.1	Jordan <i>et al.</i> 2016
	Hxt16	<b>sorbitol, mannitol</b>	NP_012692.3	Jordan <i>et al.</i> 2016
	Hxt17	<b>sorbitol, mannitol</b>	NP_014470.1	Jordan <i>et al.</i> 2016
	ITR1	<i>myo</i> -inositol	BAA14366.1	Nikawa <i>et al.</i> 1991
	ITR2	<i>myo</i> -inositol	BAA14367.1	Nikawa <i>et al.</i> 1991
	STL1	<b>glycerol</b>	AAA57229.1	Ferreira <i>et al.</i> 2005
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Fsy1	fructose	CAC08232.1	Gonçalves <i>et al.</i> 2000
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Sut1	glucose, fructose, xylose	AAD00266.1	Weierstall <i>et al.</i> 1999
	Sut2	glucose, xylose	AAD02831.2	Weierstall <i>et al.</i> 1999
	Sut3	glucose, fructose, xylose, galactose	AAD00269.2	Weierstall <i>et al.</i> 1999
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Lgt1	glucose, fructose	AAT95983.1	Alves-Araújo <i>et al.</i> 2005
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Fsy1	fructose, <b>xylitol</b> , sorbose	XP_002495678.1	Leandro <i>et al.</i> 2013
<b>Taphrinomycotina</b>				
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ght1	glucose, fructose	NP_587747.1	Lichtenberg-Fraté <i>et al.</i> 1997, Wood <i>et al.</i> 2002
	Ght2	glucose, fructose	NP_596425.1	Heiland <i>et al.</i> 2000, Wood <i>et al.</i> 2002
	Ght3	gluconate	NP_592790.1	Heiland <i>et al.</i> 2000, Wood <i>et al.</i> 2002
	Ght5	glucose, fructose	NP_587740.1	Heiland <i>et al.</i> 2000, Wood <i>et al.</i> 2002
	Ght6	glucose, fructose	NP_587739.1	Heiland <i>et al.</i> 2000, Wood <i>et al.</i> 2002
	Itr1	<i>myo</i> -inositol	CAA67211.1	Niederberger <i>et al.</i> 1998
	Itr2	<i>myo</i> -inositol	NP_593320.1	Niederberger <i>et al.</i> 1998
<b>Pezizomycotina</b>				
<i>Aspergillus nidulans</i>	MstA	glucose	CAC80843.1	Forment <i>et al.</i> 2014
	MstC	glucose	CAI54231.1	Forment <i>et al.</i> 2014
	XtrD	xylose	XP_657854.1	Colabardini <i>et al.</i> 2014
<i>Aspergillus niger</i>	MstA	glucose, mannose, xylose	AAL89822.1	Vankuyk <i>et al.</i> 2004
<i>Botrytis cinerea</i>	Frt1	fructose	AAU87358.1	Doehlemann <i>et al.</i> 2005
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Hxt1	glucose	CBA11542.1	Lingner <i>et al.</i> 2011
	Hxt2	glucose	CBA11543.1	Lingner <i>et al.</i> 2011
	Hxt3	glucose	CBA11544.1	Lingner <i>et al.</i> 2011
	Hxt5	glucose	CBA11546.2	Lingner <i>et al.</i> 2011
<i>Neurospora crassa</i>	LAT1	L-arabinose	EAA30346.3	Li <i>et al.</i> 2015



<i>Tuber borchii</i>	Hxt1	glucose, fructose, mannose	AAY26391.1	Polidori <i>et al.</i> 2007
<i>Trichoderma harzianum</i>	Gtt1	glucose	CAC81782.1	Delgado-Jarana <i>et al.</i> 2003
<i>Tuber melanosporum</i>	2281	glucose, fructose	KP718607.1	Ceccaroli <i>et al.</i> 2015
	Hxt1	glucose, fructose	KF481921.1	Ceccaroli <i>et al.</i> 2015
<i>Thermothelomyces</i>	LAT1	L-arabinose	AEO58453.1	Li <i>et al.</i> 2015
<i>thermophila</i>				

---

<sup>a</sup>Acyclic polyols are shown in bold

Table 4.2 List of candidate polyol transporter proteins used for the phylogenetic analysis

Species	Query genes <sup>a</sup>	Reference sequence <sup>b</sup> (Gene ID <sup>c</sup> )	Length (amino acids)	Transmembrane helices	
				MEMSAT3	MEMSAT-SVM
<b>Pezizomycotina</b>					
<b>Coniocybomycetes</b>					
<i>Sclerophora sanguinea</i>	<i>AmLat2</i>	241678	562	11	12
CBS100924 v1.0	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	136594	658	10	11
	<i>ScHxt15</i>	184654	538	10	12
<b>Dothideomycetes</b>					
<i>Diplodia corticola</i> CBS 112549	<i>ScHxt15</i>	XP_020129849.1	571	12	11
<i>Diplodia seriata</i> DS831	<i>DhSyl1</i>	KKY19172.1	653	11	11
<i>Glonium stellatum</i> CBS 207.34	<i>DhSyl2</i>	OCL04378.1	637	10	11
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	<i>AmLat2</i>	XP_007930618.1	556	12	12
<b>CIRAD86</b>					
<i>Trypethelium eluteriae</i> v1.0	<i>AmLat2</i>	440123	543	12	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	500005	623	10	11
	<i>ScHxt15</i>	128538	592	5	10
<b>Eurotiomycetes</b>					
<i>Aspergillus nomius</i> NRRL 13137	<i>AmLat2</i>	XP_015407194.1	754	12	12
<i>Coccidioides immitis</i> H538.4	<i>DhSyl1</i>	KMU91130.1	844	12	12
<i>Endocarpon pusillum</i> Z07020	<i>AmLat2</i>	4708	579	11	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	1090	623	11	11
	<i>ScHxt15</i>	5810	524	12	12
<i>Penicillium nordicum</i> DAOMC 185683	<i>ScHxt15</i>	KOS37549.1	563	12	11
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	<i>DhSyl2</i>	XP_002583310.1	649	10	11
<b>Lecanoromycetes</b>					
<i>Cladonia grayi</i> Cgr/DA2myc/ss v2.0	<i>AmLat2</i>	3543	578	11	11
		3537	584	11	12
		8535	575	11	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	2664	614	11	11
		4326	665	11	11
		1127	643	10	11
		7345	619	4	10
	<i>ScHxt15</i>	1746	599	12	11
<i>Lasallia pustulata</i> v1	<i>AmLat2</i>	contig 338, gene position 26576–28409 (g10505)	573	11	12

		contig 3496, gene position 17264–19336 (g11659)	620	9	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	contig 837, gene position 52680–62564 (g3990)	2207	NC	NC
		contig 1791, gene position 32590–34641 (g11434)	655	10	11
		contig 3577, gene position 7605–11916 (g6892)	1125	11	10
	<i>ScHxt15</i>	SLM39237.1	548	11	11
<i>Lobaria pulmonaria</i> Scotland reference genome	<i>AmLat2</i>	1075510	562	12	12
		717725	573	11	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	1261078	645	10	11
		407424	648	11	11
		1270634	619	11	10
		638017	638	11	11
	<i>ScHxt15</i>	1267150	539	12	12
<i>Ramalina conduplicans</i> KY1401 (in this study)	<i>AmLat2</i>	LC456214 (g3682)	574	11	12
		LC456215 (g4707) = LC375945 (Lat2)	570	11	12
		LC456216 (g6856)	621	6	12
	<i>DhSyl1</i>	LC456217 (g806) = LC375944 (Syl1)	645	11	11
		LC456218 (g3796)	669	11	10
		LC456219 (g8137)	635	11	11
		LC456220 (g6460)	909	11	12
		LC456221 (g1008)	1,583	NC	NC
<i>Usnea florida</i> ATCC18376 v1.0	<i>AmLat2</i>	817483	576	12	12
		877507	573	11	12
	<i>DhSyl1</i> & <i>DhSyl2</i>	816522	643	11	11
		880758	613	11	11
		873497	642	10	11
		717331	649	11	11
		891961	621	6	10
	<i>ScHxt15</i>	815118	547	12	11
<i>Xanthoria parietina</i> 46-1-SA22 v1.1	<i>AmLat2</i>	1618183	614	12	12
		1578916	559	11	12
		1234738	566	11	12

	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	1660360	674	10	10
		1645041	658	11	10
		1606405	654	11	10
		81021	627	11	11
		1572476	619	4	10
		1613179	608	11	11
	<i>ScHxt15</i>	1602355	531	12	12
<b>Leotiomycetes</b>					
<i>Glarea lozoyensis</i> ATCC 20868	<i>AmLat2</i>	XP_008087870.1	552	11	12
<i>Oidiodendron maius</i> Zn	<i>ScHxt15</i>	KIN01525.1	567	11	11
<i>Phialocephala scopiformis</i> CBS 120377	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	XP_018072650.1	614	10	11
<b>Orbiliomycetes</b>					
<i>Arthrotrichy oligospora</i> ATCC 24927	<i>ScHxt15</i>	XP_011123148.1	551	12	11
<i>Dactylectella haptotyla</i> CBS 200.50	<i>AmLat2</i>	XP_011106430.1	555	12	12
	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	XP_011106845.1	612	11	12
<b>Pezizomycetes</b>					
<i>Pyronema omphalodes</i> CBS 100304	<i>AmLat2</i>	CCX06871.1	573	12	12
	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	CCX32903.1	621	11	11
	<i>ScHxt15</i>	CCX04720.1	508	12	12
<b>Sordariomycetes</b>					
<i>Daldinia</i> sp. EC12	<i>ScHxt15</i>	OTB11998.1	539	12	11
<i>Phaeoacremonium minimum</i> UCRPA7	<i>AmLat2</i>	XP_007914611.1	563	12	12
<i>Thermothelomyces thermophila</i> ATCC 42464	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	XP_003667183.1	655	10	11
<b>Xylonomycetes</b>					
<i>Symbiotaphrina kochii</i> v1.0	<i>AmLat2</i>	778756	540	12	12
	<i>ScHxt15</i>	658577	567	11	11
<i>Trinosporium guianense</i> CBS132537 v1.0	<i>DhSyl1</i>	589593	613	10	11
<i>Xylona heveae</i> TC161 v1.0	<i>DhSyl2</i>	33643	656	10	11
<b>Taphrinomycotina</b>					
<i>Neolecta irregularis</i> DAH-3	<i>DhSyl1 &amp; DhSyl2</i>	OLL27129.1	623	9	11
<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y-17804	<i>AmLat2</i>	XP_019021487.1	520	12	12

<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	ScHxt15	XP_002175189.1	539	12	11
--------------------------------------	---------	----------------	-----	----	----

yFS275

---

<sup>a</sup>Abbreviations: *AmLat2* = *Ambrosiozyma monospora*' Lat2, *DhSyl1* & *DhSyl2* = *Debaryomyces hansenii*' Syl1 and Syl2, ScHxt15 = *Saccharomyces cerevisiae*' Hxt15

<sup>b</sup>GenBank accession number or MycoCosm Protein ID

<sup>c</sup>Constructed by Augustus

NC, not calculated

Table 4.3 Identity and similarity of candidate polyol transporter proteins isolated from *Ramalina conduplicans* KY1401

Global Alignment*	<i>RcLat2</i> × <i>AmLat2</i>	<i>RcSyl1</i> × <i>DhSyl1</i>	<i>RcSyl1</i> × <i>DhSyl2</i>
Identity (% , bp)	46.1 (273 / 592)	47.5 (328 / 690)	46.9 (318 / 678)
Similarity (% , bp)	62.7 (371 / 592)	61.3 (423 / 690)	60.9 (413 / 678)

\*Used program was needle ver. 6.6.0. Abbreviation: *AmLat2* = *Ambrosiozyma monospora*' L-arabinose transporters (Verho *et al.* 2011) which demonstrated the ability of transporting polyols including ribitol (Londesborough *et al.* 2014), *DhSyl* = *Debaryomyces hansenii*' symporter polyols (Pereira *et al.* 2014).

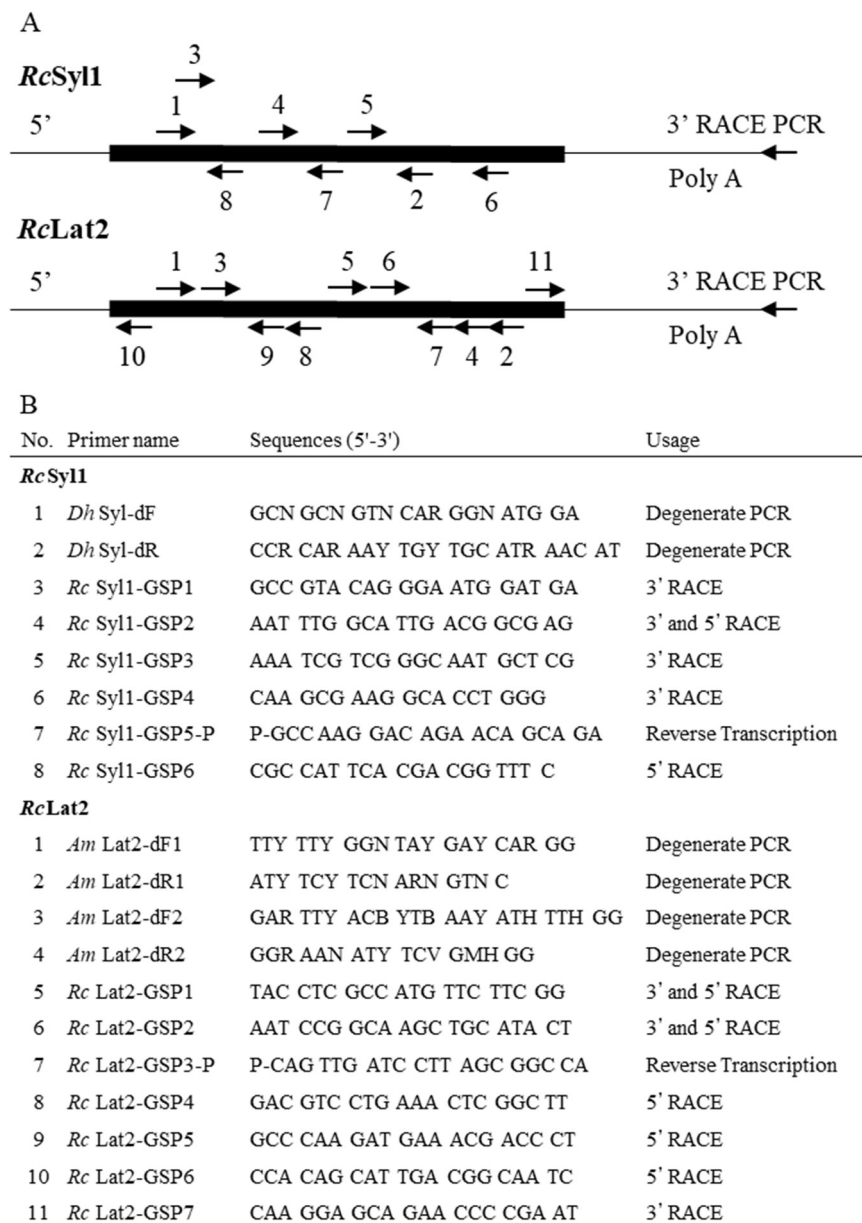


Fig. 4.1 List of primers designed in this study for the degenerate PCR and RACE of *RcSyl1* and *RcLat2*. (A) Primer positions in each cDNA sequence. (B) List of primer names and sequences. Abbreviations: Syl = symporter polyols (Pereira *et al.* 2014); Lat = L-arabinose transporters (Verho *et al.* 2011); GSP = Gene-specific primer; RACE = Rapid amplification of cDNA ends; P = phosphorylated.

```

RcSyl1 1 ---MAYNERPKSDSSGHSTNETRIEHMEYDDRNHSIPRSSRNFSSLAAERMRRNAAAKLA 57
DhSyl1 1 MSSSAINEKPIMTDSDEANPDVGLFEPSSNSSIVEEKRRVSELESVHASKIAEPGQGEK-G 59
DhSyl2 1 MPSETNPEKPVALRSDNPHEENGLFEHSSNSF-NEKRRVSELESSIHASKIAEPGQGEK-G 58

RcSyl1 58 NPLAGISHAKLEEMGASYARKHQIGDEEDIRAEQKGACLAQDPKRYHQVAGLTAKEMSVL 117
DhSyl1 60 NILSQYSEKQVMQMGGRNYALKYDM--DFDL--FASAAALARTPDEFNAMPFLSEEQKEAL 115
DhSyl2 59 NILSQYSEKQVMQMGGRNYALKYDL--DFDL--FARAAALARTPDDFNAMPFITTEEEKQAL 114

RcSyl1 118 KREFENRWSQPKLMIIVIILCSTCAAVQGMDEIVVNGAQLFYKYQFGID-GEDSR----S 172
DhSyl1 116 HKESTKKWHIPSKLIQVIALGSMAAAVQGMDESVINGAVLFYPNYMGVGKGEYNRFGYDT 175
DhSyl2 115 HKEHTKKWHIPSKLIQVIALGSMAAAVQGMDESVINGALLFYPNYMGVGKGEYNRFGYDT 174

RcSyl1 173 TWLTGLLNSAPYLCCSVLGCWLTTPFNNLFGRGTIFLTCVFSALACFWQGFVNTWWHMF 232
DhSyl1 176 DLLEGLINGAPYLCASCLACWMADSWNRRLGRKWTIFWTCLISAVTCFWQGFTNTWYHLF 235
DhSyl2 175 DMIEGLINGAPYLCASCIACWMSDLWNRHLGRKWTIFWTCLISALTCFWQGFTNTWYHLF 234

RcSyl1 233 IARFFLGFGIGEKSATVPIYAAETSPPAIRGALVMQWQMWTAFGIMLGYVSDLAFYKVPD 292
DhSyl1 236 IARFMLGFGIGEKSATVPAYAAECTPKQIRGALVMLWQFFTAFGIMLGYVACLAFYHVGD 295
DhSyl2 235 IARFMLGFGIGEKSATVPAYAAECTPKQIRGALVMLWQFFTAVGIMFGYVACLAFYHVGD 294

RcSyl1 293 SSGIVGLNWRIMMASAMPALVVICFVFLCPESPRWYMSKNRHYKAYESMRWLRYEKVQA 352
DhSyl1 296 HGIGGGLNWRIMLGSACIPAIVVLFQIPFVESPRWLMGKDRHKDSYSLCQLRLDKIAA 355
DhSyl2 295 HGIGGGLNWRIMLGSACIPAIIVLFQIPFVESPRWLMGKDRHKDSYSLCQLRLDKIAA 354

RcSyl1 353 ARDVYMYTLLEAEKEVQQLHG-NPLVELIKVPRNRRAMLASEIVMFMQQFCGVNVIAYY 411
DhSyl1 356 ARDTFYQYVLLQEEASYQGIPTWKRLVEMFTIRRNRNGALGAWIVMFMQQFCGINAIVYY 415
DhSyl2 355 ARDTFYQYVLLQEEASYQGIPTWKRLVEMFTIRRNRNGALGAWIVMFMQQFCGINAIVYY 414

RcSyl1 412 SSQIFLDARFSPISSALTASLGFGLINWIFAIPAIYTIDTFGRRNLLLTFPLMSIFLFFT 471
DhSyl1 416 NSTIFIRGGFTEVAALTASWGFGMVNFLFAIPTYTIDTFGRRNLLLTFPLMSIFLFWT 475
DhSyl2 415 NSTIFIQGGFTEVDALTASWGFGMVNFLFAIPTYTIDTFGRRNLLLTFPLMAIFLIWT 474

RcSyl1 472 GFSFFISDESQHTARVACVALGIYLFGIVYSEGEGVPVPFTYSAEAYPLYVRTYGMSLATA 531
DhSyl1 476 GFGF-LASND-QT-RIGIVASGVYIFSAIYSAGEGPVPFTYSAEAFPLYIRDIGMGFATA 532
DhSyl2 475 GLGF-VAEDGTKT-QTGIVASGVYIFSAIYSAGEGPVPFTYSAEAFPLYIRDIGMGFATA 532

RcSyl1 532 TLWFFNFVLSITWPSLQTAFTTPGAFAWYATWNIGFFLVLLFMPEAKAKTLEELDQVFS 591
DhSyl1 533 TCWFFNFVLSITWPKLVSSFTSTGAFGWYAAWNIVGFFLVLVFLPETKGLTLEELDEVFS 592
DhSyl2 533 TCWFFNFVLSITWPKLVSSFGRITGAFMWYAAWNIAGFFLVLVFLPETKGLTLEELDEVFS 592

RcSyl1 592 VPTRLHATYGLRQIPYFRRYLLRQHCEP-ERLYENDETGEDRDVGFDHDPEGGF-- 645
DhSyl1 593 VSTRKHAKWQTKHFLNGIQRVVLRRHIDPLPPLYEHQKRLAVTNPDWNNKTETAHIE 649
DhSyl2 593 VSTRKHAIYQTKSILNSFQRVVLRRHIDPLPPLYEHQKRLAVTNPDWNNKTETAHIE 649

```

Fig. 4.2 Alignment of RcSyl1, DhSyl1 and DhSyl2. Abbreviation: Rc = *Ramalina conduplicans*, Dh = *Debaryomyces hansenii*, Syl = Symporter Polyols (Pereira *et al.* 2014).



```

RcLat2  1  -----MDRISKFNVARRLEKRSLLIAYNEVAGLSIFFFFGYDQGVMSGVNINRNYA 50
AmLat2  1  MGQFIEKFRDWTLPQHLLVENYLHGKRLTHSVVLSALAIFFFFGYDQGVMSGVNNSPDYV 60

RcLat2  51  ETMGFGYWDITKNPPAVKETSILLKGGIVAVYLLPGTLFGAFLGGWFGDRYGRIKIITALA 110
AmLat2  61  KIMKFGYWD-----EDANVIVTDSITKGGIVSIIYF-GTLCGCLFGGWYSDFGRIKSIALS 116

RcLat2  111  SVWAIVGAILQCSAONATWMFCAITLNGIGTGILNAITPVVATETASHTSRGQFVAIEFT 170
AmLat2  117  ALIAIVGAILQCSAKSVAWMCGARFLNGIGTGILNAVVPVYSSETAETASRGAYICLEFT 176

RcLat2  171  LNIIFGVVAAYWIEYGTSEFYSIKDSDFIWRFPFAFQIIVPLIFLAIIVEALPESPRILIKVG 230
AmLat2  177  LNILGVVIAAYWIEFGLSYLGLMNS-ERWRFPFQIIVPLIFLFLILLCWSPESPRYLKIG 235

RcLat2  231  REEEGRFILDGRIRGEGDGLAEAEFQDVRNIVELEKRTSKONSYLAMFFGW-----K 281
AmLat2  236  HHDRLALILKKEERGEERG-AEEFNEIVATFEYEKDSALSTINYVRIFFDQYKGTPEAVAK 293

RcLat2  282  SGKLHIGRRVHIVVWILQILOEWI GIAGITTYGPTIFSIAGVAAKDQDWISGLNDIITYEFS 341
AmLat2  294  AKKLHIGRRVQIVVWFQILOEWC GIAGITTYQTDIFQAGYSAKKSQNTAGINNIIFYCLS 353

RcLat2  342  TLVCFVTLDRIGRRITLYWGSVVGOGICMFVAGGLARATINASEGNKSGVGGAAVFEVELF 401
AmLat2  354  TLVAVFTIDRIGRRFVTFWVGCTGEGIAMFELAGGLSKAQQHLHLDNKANGAASTA-EVEIY 411

RcLat2  402  TAIFGATILIVPNLYPAEIIFFLEVRARGNATGVVGSVGNWITLLIPDMFPAALNEKALY 461
AmLat2  412  TSIFGSTILITIPWIIPESEFFPLKLRAGNATGVVGSVGNWITLLIPDMFPAALHEKILY 471

RcLat2  462  VFGAVNAATIVIVVALYPETNORTLEEINLVFASDSIWNWEABERNFAILKEONPELVQAA 521
AmLat2  472  IFGASNFFTLIVVYLLYPETANRTLEEIDFLFASKNPLVPACEAEFRRLLKEZHRLASLGD 531

RcLat2  522  GRGHSVIDPETGERRGSAIPRNMSLDTRKAYEKGTHDASSEEEKATSKHL 570
AmLat2  532  SAEVLNEEKPTDELKDSVSSV----- 552

```

Fig 4.3 Alignment of *RcLat2* and *AmLat2*. Abbreviation: *Rc* = *Ramalina conduplicans*, *Am* = *Ambrosiozoma monospora*, Lat2 = L-arabinose transporters (Verho *et al.* 2011) which demonstrated the ability of transporting polyols including ribitol (Londesborough *et al.* 2014).

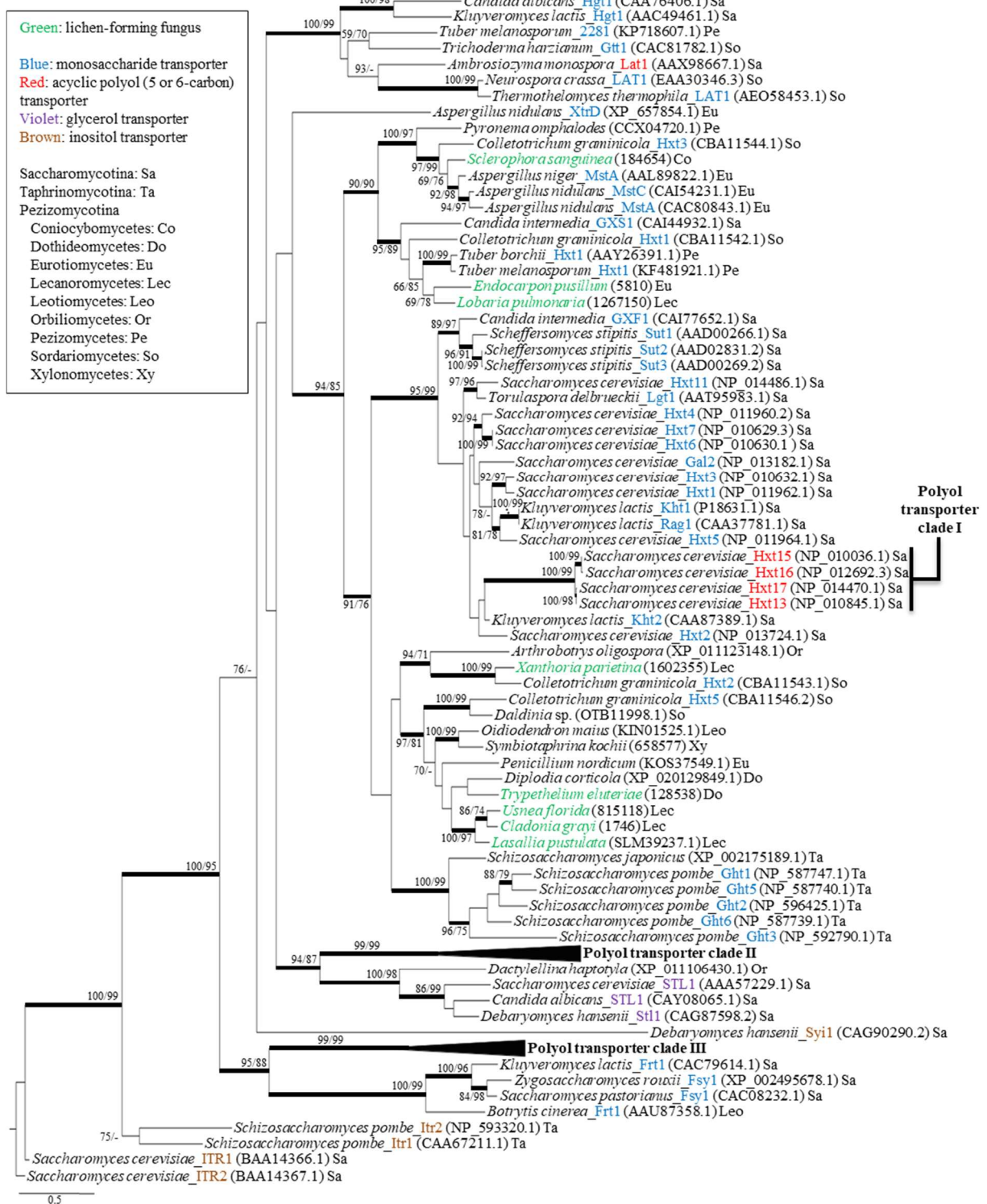
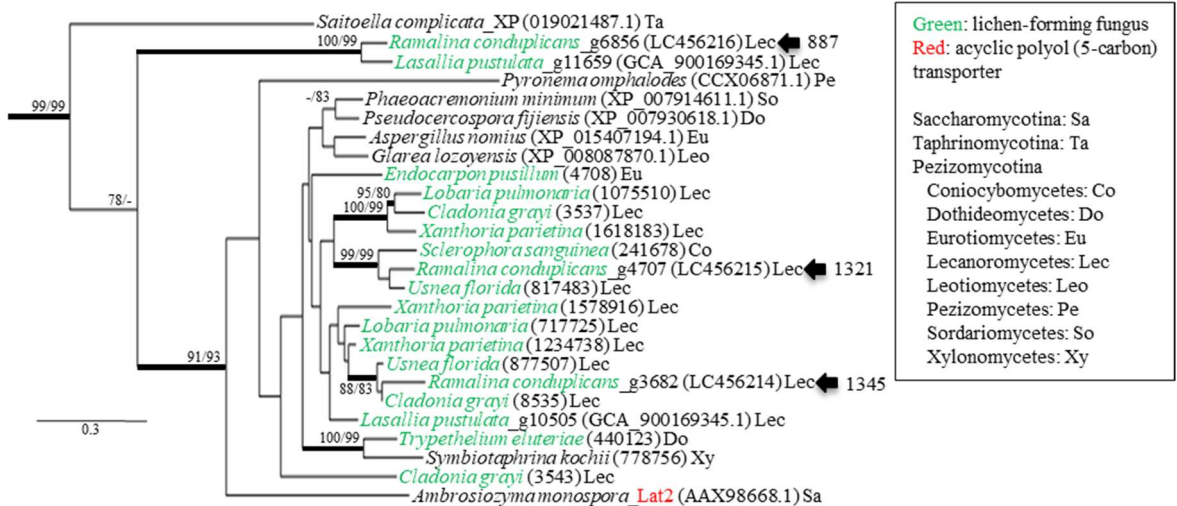


Fig. 4.4 A phylogenetic tree resulting from a maximum-likelihood (ML) analysis based on amino acid sequences of polyol and monosaccharide transporters in Ascomycota. Bootstrap values calculated from 1,000 replications are shown near the nodes ( $\geq 50\%$ , ML method/maximum-parsimony (MP) method) when the values resulting from ML and/or MP methods are over 70. In addition, the nodes that supported by both ML and MP methods ( $> 70\%$ ) are depicted as thick lines.

In each branch, characterized proteins that demonstrated the capability to transport monosaccharides and/or polyols listed in Table 4.1 are colored as follows: blue for monosaccharide, red for acyclic polyol (5 or 6-carbon), violet for glycerol, and brown for inositol transporters. The transporters that transport both monosaccharides and acyclic polyols, are distributed in accordance with the substance they transport more efficiently. Lichen-forming fungi are shown in green characters. Characterized transporters and selected candidates of polyol transporters are denoted with species' name, the protein's name for characterized transporters, GenBank accession number or MycoCosm protein ID, and fungal class or subphylum. The following abbreviations were used: Coniocybomycetes, Co; Dothideomycetes, Do; Eurotiomycetes, Eu; Lecanoromycetes, Lec; Leotiomyces, Leo; Orbiliomyces, Or; Pezizomyces, Pe; Sordariomyces, So; Xylonomycetes, Xy; Taphrinomycotina, Ta; and Saccharomycotina, Sa.

A



B

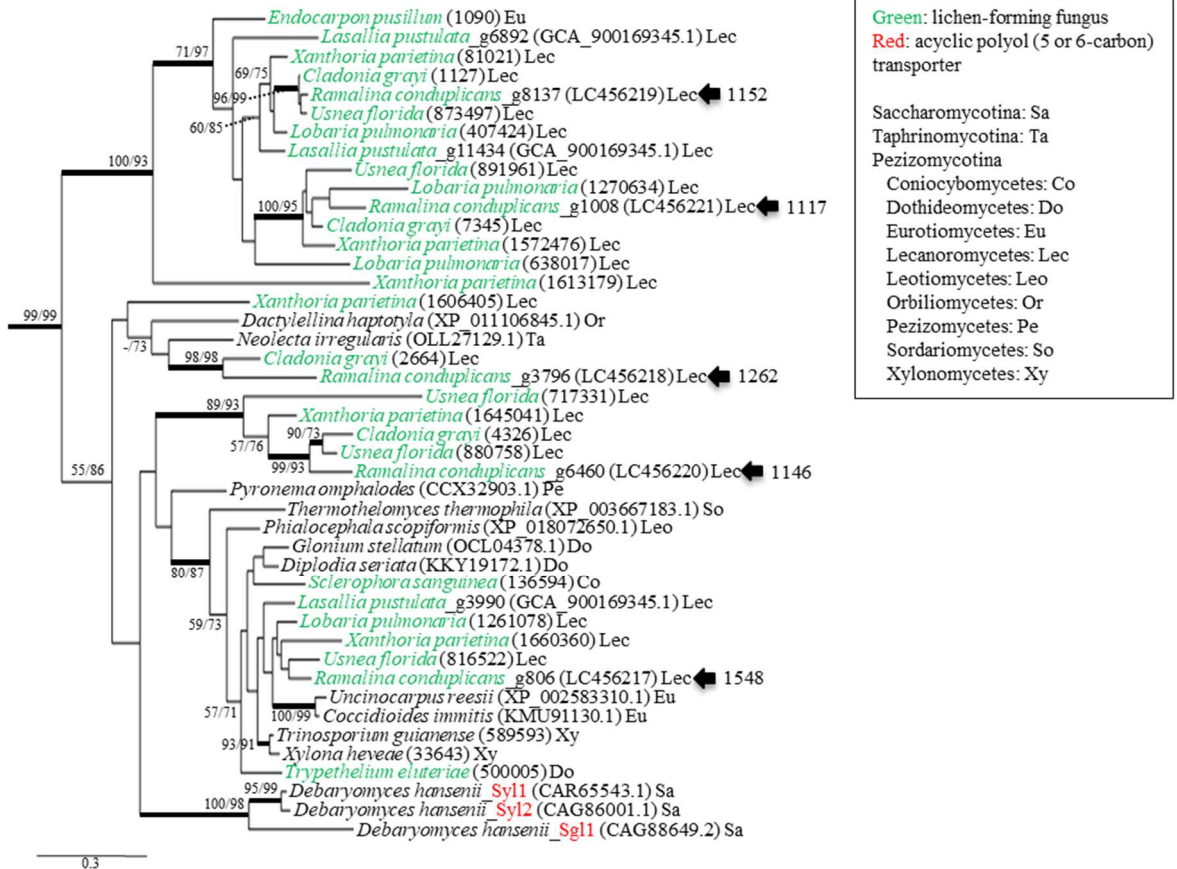


Fig. 4.5 Partial details of the phylogenetic tree found in Fig. 4.4. (A) Polyol transporter clade II constructed with *Ambrosiozyma monospora* Lat2 and similar proteins. (B) Polyol transporter clade III constructed with *Debaromyces hansenii* Syl1, *D. hansenii* Syl2, and similar proteins. Bootstrap values are shown near the nodes ( $\geq 50\%$ , maximum-likelihood (ML) method/maximum-parsimony)

(MP) method) when the values resulting from ML and/or MP methods are over 70. In addition, the nodes that supported by both ML and MP methods (> 70%) are shown thick internal branches. Characterized acyclic polyol (5 or 6-carbon) transporters are shown in red characters. Lichen-forming fungi are shown in green characters. Each branch contains the species' name, the protein's name for characterized transporters, gene ID constructed by Augustus for *Ramalina conduplicans* and *Lasallia pustulata*, GenBank accession number or MycoCosm protein ID, and fungal class or subphylum. The proteins selected from the genome of *Ramalina conduplicans* are indicated by arrows and the BLOSUM-62 matrix scores are included. The following abbreviations were used: Coniocybomycetes, Co; Dothideomycetes, Do; Eurotiomycetes, Eu; Lecanoromycetes, Lec; Leotiomycetes, Leo; Orbiliomycetes, Or; Pezizomycetes, Pe; Sordariomycetes, So; Xylonomycetes, Xy; Taphrinomycotina, Ta; and Saccharomycotina, Sa.



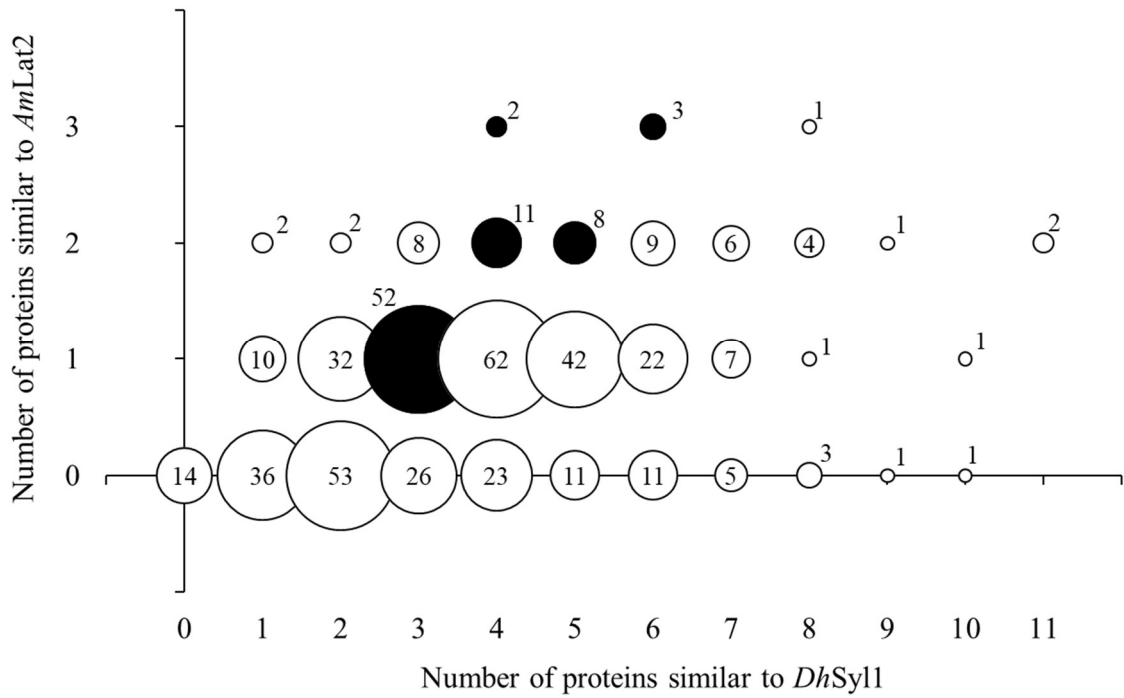


Fig. 4.6 Numbers of proteins similar to polyol transporters *Ambrosiozymba monospora*' Lat2 and *Debaryomyces hansenii*' Syl1 among 472 genome sets. Black circles include lichen-forming species belonging to Lecanoromycetes. White circles include other class of lichen-forming and non-lichenized fungi.

## 第5章 地衣類を構成する子囊菌類におけるポリオールの資化性

### 5.1 目的

地衣体を主に構成する共生菌は、共生藻に対して光合成や生育に最適な環境を提供している。すなわち、光量の調節、極度な乾燥や湿潤条件への適応、および紫外線耐性の強化などにより、地衣体内部の共生藻を保護している (Honegger 2012)。それに対して、地衣化する緑藻は特定のポリオールを、地衣化するシアノバクテリアはグルコースをそれぞれ光合成により生産し、共生時にはそれらを細胞外へ放出する (Smith 1968, Richardson *et al.* 1968)。地衣化する緑藻が合成するポリオールは属によって決まっており、代表的な *Trebouxia* 属ではリビトールを生産・放出している (Bednar and Smith 1966, Richardson and Smith 1968b)。共生菌はそれらの光合成産物を基に、マンニトールやアラビトールを合成する (Drew and Smith 1967, Richardson and Smith 1968a)。Chapman *et al.* (1994) は南極における地衣類、藻類および蘚類のポリオール (リビトール, ソルビトール, マンニトールおよびアラビトール) と糖類 (グルコース, フルクトースおよびスクロース) について調べ、乾燥重 1 g 当たりのポリオール (リビトール, マンニトールおよびアラビトール) の総量が地衣類では 11–65 mg で糖類の総量の 3.8–42.5 倍であったのに対し、藻類および蘚類ではポリオールがほとんど検出されなかったことを報告している。この他にも、ポリオールが地衣類の主要な可溶性炭水化物であることが多く報告されている (Lewis and Smith 1967, Roser *et al.* 1992, da Silva *et al.* 1993, Gaio-Oliveira *et al.* 2005)。

地衣体内で保護され生活する共生藻のように、地衣体内には様々な非地衣化真菌類が存在する。これら地衣体に潜む真菌類は総称して lichen-inhabiting fungi (Muggia and Grube 2018) や endolichenic fungi (Honegger 2012) と呼ばれる。特に endolichenic fungi は、地衣体に病徴を示さず、貧栄養である地衣体で生育する内生菌と定義されている (Honegger 2012)。このような地衣体に潜む真菌類を本研究では地衣内生菌と呼ぶ。これまで地衣内生菌は、分離培養 (Li *et al.* 2007, Arnold *et al.* 2009, U'Ren *et al.* 2010, Suryanarayanan *et al.* 2017,

Lagarde *et al.* 2018), 次世代シーケンサー (U'Ren *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2016, Fernández-Mendoza *et al.* 2017), 走査電子顕微鏡や蛍光顕微鏡 (Fluorescence in situ hybridization: FISH など) による可視化技術 (Honegger *et al.* 2013, Spribille *et al.* 2016) などを用いた研究によって調べられてきた。しかしながら, 地衣体内で内生菌がどのように栄養を獲得しているかなどはほとんど明らかにされていない。例えば, Sordariomycetes に属す Xylariaceae は, 地衣類 (Suryanarayanan *et al.* 2017, Lagarde *et al.* 2018) や陸上植物 (Davis *et al.* 2003, Osono *et al.* 2013) から分離される内生菌としてよく知られているが, 宿主体内における栄養摂取様式や宿主に対する明らかな影響は知られていない。真菌類は単糖類, 二糖類からセルロースやデンプンなどの多糖類, さらに植物を木化させるフェノール性高分子化合物であるリグニンなど, 幅広い物質を炭素源とすることができ, 腐生, 殺生, 共生といった栄養摂取様式を持つ。したがって, 炭素源などの代謝能力を明らかにすることは, 真菌類の生理や生態を知る上で重要である。しかしながら, 地衣体における主要な炭素源であるポリオールについて, 地衣内生菌による資化性は分かっていない。

*Ramalina* 属は世界中に分布し (Kirk *et al.* 2008), リビトールを放出する緑藻である *Trebouxia* 属を共生藻とする。Komiya and Shibata (1971) によると, *R. crassa* および *R. subbreviscula* は共生藻由来のリビトールと共生菌由来のアラビトールおよびマンニトールを保持していた。またこれまでに, 地衣体表面を殺菌処理した *Ramalina* spp. から様々な真菌類が分離されている (Li *et al.* 2007, used *R. sinensis*; Suryanarayanan *et al.* 2017, used *R. conduplicans*; Lagarde *et al.* 2018, used *R. fastigiata*). *Flavoparmelia caperata* (キウメノキゴケ) も世界中に分布し (Kirk *et al.* 2008), 様々な国で主要な地衣類に位置付けられ (Søchting 2004, Godinho *et al.* 2008, Tretiach *et al.* 2012), *Ramalina* 属と同様に *Trebouxia* 属を共生藻とする (e. g. Beck *et al.* 1998)。これらの地衣類に対し, *Peltigera degenii* (ウスツメゴケ) はグルコースを放出するシアノバクテリア (*Nostoc* 属) を共生藻とする。シアノバクテリアを共生藻とする地衣類においても同様に共生菌によるマンニトールの貯蔵が知られている。例えば, *Nostoc* 属を共生藻とする他の *Peltigera* 属; *P. polydactyla* (current name: *P.*



*polydactylon*), *P. horizontalis* および *P. canina* var. *praetextata* (current name : *P. praetextata*) から主要な可溶性炭水化物としてマンニトールが検出されている (Smith 1961, Smith 1963, Smith 1968, Tysiaczny and Kershaw 1979, Eisenreich *et al.* 2011). 地衣体における光合成産物が共生藻によって変わることから, 地衣内生菌のポリオールの資化能力についても違いが見られる可能性がある. また第 2 章において, 地衣化子囊菌 *Ramalina conduplicans* はスクロースよりもリビトールを炭素源とした場合により高い生長率を示した. 以上を踏まえ, 本章では *Trebouxia* 属を共生藻とする *Ramalina* spp. および *F. caperata*, さらに *Nostoc* 属を共生藻とする *P. degenii* から地衣内生菌を分離し, それらのポリオール (リビトールおよびマンニトール) の資化性について試験し, 共生菌と同様に地衣内生菌についてもポリオールの資化性を有しているかどうかを明らかにすることを目的とした.

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 試料の採集, 形態観察および化学成分分析による種同定

外部形態に病徴を示さない *Ramalina* 属 3 個体 (Table 5.1 および Fig. 5.1) を長野県の小黒川溪谷付近 (Nagano, Japan, 35°49'N 137°52'E) にて 2018 年 5 月 26 日に採集した. 採集した地衣体は外部形態および化学成分を調べた. 化学成分の検出は薄層クロマトグラフィにより行い, Culberson and Kristinsson (1970), Culberson (1972) および Culberson and Johnson (1976, 1982) で確立された方法に従い, 展開溶媒 A (ヘキサン : ジオキサン : 酢酸 = 180 : 45 : 5) および B' (ヘキサン : メチル tert-ブチルエーテル : ギ酸 = 140 : 72 : 18) を用いた. これらの結果を基に, Sakata *et al.* (submitted) に従い, 種を同定した. 全ての実験が終了した後, 標本は乾燥させ, 千葉県立中央博物館に寄贈した.

### 5.2.2 菌類の分離培養

採集した地衣類は紙袋に個体ごと入れ, さらにポリ袋に入れ持ち帰り, 4°C の冷蔵庫内で

保存し、1週間以内に以下の処理を行った。地衣体の滅菌処理方法および地衣内生菌の分離方法は U'Ren *et al.* (2012) に記載された方法に一部変更を加えた。実体顕微鏡下でピンセットを用い、地衣体外部の付着物を丁寧に取り除いた。さらに流水でよく洗浄した後、地衣体緑黄色部分から約 0.5 cm の断片を複数得た。地衣体断片は順に 95%エタノール溶液に 30 秒、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 分または 2 分間、70%エタノール溶液に 2 分間浸漬させ、それぞれの過程でボルテックスを用いてよく攪拌することで表面を殺菌した。ガラスシャーレ内にろ紙を敷き乾熱滅菌したものを用意し、送風状態のクリーンベンチ内で、ろ紙上に滅菌処理を施した地衣体断片を置き、一晚風乾させた。地衣体断片はさらに約 2.5 cm に切断し、2 種類の富栄養培地に静置し、暗条件、25°Cで 2 ヶ月間培養した。富栄養培地は麦芽エキス寒天培地 (MA 培地, 2%麦芽エキスおよび 2%寒天) と麦芽・酵母エキス寒天培地 (MYA 培地, 2%麦芽エキス, 0.2%酵母エキスおよび 2%寒天) を使用した。麦芽エキス, 酵母エキスおよび寒天は全て Becton, Dickinson and Company 社製のものを使用した。地衣体断片から発生した真菌類をその都度植え継ぎ、菌株を確立した。

### 5.2.3 菌類の分子同定

Izumitsu *et al.* (2012) に方法に従い、確立した全ての菌株からゲノム DNA を抽出した。一部、上記の方法で PCR 増幅ができなかった菌株および採集した地衣体から、CTAB 法によりゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA 溶液は、核リボソーム DNA (nrDNA) 内の内部転写領域 (internal transcribed spacer (ITS) regions) および 5.8S nrDNA の増幅するための鋳型に用いた。PCR 反応液 (100  $\mu$ L 当たり) : 10  $\mu$ L 10 $\times$  PCR Buffer for KOD-Plus-, 10  $\mu$ L 2mM dNTPs, 4  $\mu$ L 25mM MgSO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ L 1U  $\mu$ L<sup>-1</sup> KOD-Plus- (Toyobo 社製), 3  $\mu$ L 10  $\mu$ M each primer, 1–4  $\mu$ L ゲノム DNA 溶液および滅菌蒸留水を作製し、KOD-Plus-のプロトコルに従って、加熱処理した。真菌類に対するプライマーとして ITS5 および ITS4 (White *et al.* 1990) を、共生藻に対するプライマーとして ITS1T および ITS4T (Kroken and Taylor 2000) をそれぞれ用いた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。単一のバンドを

確認した後、PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で精製した。精製産物を鋳型として、10  $\mu$ L のサイクルシーケンス反応液：0.5  $\mu$ L Ready Reaction Mix (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 1.0  $\mu$ L Big Dye sequencing buffer, 1.0  $\mu$ L of 1.6- $\mu$ M each primer, 10–20 ng Template および蒸留水を作製し、加熱処理：96°C, 1 分間の後、96°C, 10 秒間；50°C, 5 秒間；60°C, 4 分間のサイクルを 25 回繰り返した。エタノール沈殿により反応液から不要なプライマー等を除去し、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンシングを行った。得られた波長および塩基配列は BioEdit ver. 7.2.5 (Hall, 1999) および GENETYX ver. 12. (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan) で編集した。nrITS の塩基配列の類似性が 97%以上を基準とした操作的分類単位 (OTU) を定め、塩基配列を取得した全ての菌株を分類した。各 OTU から一株選び、GenBank に登録されたタイプ標本または学術論文で系統解析または形態観察により同定された標本またはその菌株から得られた塩基配列により、分類学的所属を推測した。現在の学名については、Mycobank (<http://www.mycobank.org/>) および Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) において確認した。以降の実験に供した菌株の一部は NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) へ寄託した。

#### 5.2.4 ポリオールの資化性

*Ramalina* spp.の内生菌で異なる OTU に分類された 18 菌株と Masumoto and Degawa (in prep.) において *Flavoparmelia caperata* および *Peltigera degenii* から分離された内生菌各 6 菌株の計 30 株を、以下のポリオール資化性試験に供した。菌株はそれぞれの生育速度によって 17–38 日間、MYA 培地で前培養した。本培養には一部改変した Lilly and Barnett's medium (LB 培地, Lilly and Barnett 1951) を用いた。培地は炭素源の違いにより 4 試験区設けた。すなわち、単一の炭素源としてグルコース (ポジティブコントロール), リビトール, マンニトールをそれぞれ添加する区と炭素源を添加しない区を設定した。培地組成については Table 5.2 に示した。作製した寒天培地の表面には滅菌したセルロース膜を密着さ

せた。オートクレーブ滅菌処理した直径 6 mm のストローを用い、前培養した菌株コロニーの縁から寒天培地ごと菌体をくり抜き、それぞれの炭素源を含んだ LB 培地プレート (90 mm シャーレを使用) のセルロース膜上の中央に各 3 反復で接種した。菌株は暗条件、25°C で、2-8 週間培養した。1 週間ごとに摂取した寒天片の縁から最大および最小を含む菌糸長を 10 ヶ所測定した。また培養後はプレートの写真を撮り、セロファン膜ごと菌体を回収し、70°C で 24 時間乾燥させ、セロファン膜ごと乾重量を測定した。ストローでくり抜いた寒天片とセルロース膜の乾重量は  $0.1575 \pm 0.0002$  g ( $n = 5$ ) であり、寒天片とセルロース膜による乾重量のばらつきがほとんどないことを確認し、全ての乾重量から 0.1575 g を差し引いて菌体乾重量とし、Fig. 5.3 に示した。菌体乾重量を基に Tukey-Kramer 法 ( $p < 0.05$ ) による多重比較検定を行い、炭素源を添加しない区に対して有意差がある区の炭素源を資化したと判断した。

### 5.3 結果

#### 5.3.1 標本の同定

外部形態および化学成分によって、3 個体の *Ramalina* 属の種を以下の通り同定した：  
*Ramalina conduplicans* Vain. (sample ID: 18052607), 地衣体は約 3 cm, 扁平であり、擬盃点があり、穿孔はなく、地衣体内部は中実でいくつかの子器を持っていた、化学成分は salazinic acid, homosekikaic acid, usnic acid および sekikaic acid と推定された；*R. dilacerata* (Hoffm.) Vain. (sample ID: 18052604), 地衣体は約 3 cm, 扁平よりは円筒状であり、擬盃点はなく、穿孔は地衣体全体の分岐根元にあり、内部菌糸はクモの巣状で多くの子器を持っていた、化学成分は usnic acid および sekikaic acid と推定された；*R. dilacerata* (Hoffm.) Vain. (sample ID: 18052612), 地衣体は約 2.5 cm, 扁平よりは円筒状であり、擬盃点はなく、穿孔は一部にあり、内部菌糸はクモの巣状で非常に多くの子器を持っていた、化学成分は usnic acid および sekikaic acid と推定された。3 個体全ての地衣体から共生菌および共生藻

の nrITS 塩基配列を取得し、GenBank に登録した (Table 5.1)。3 個体の地衣体から得られた共生藻の nrITS 塩基配列を BLAST 検索した結果、上位 100 の配列は全て *Trebouxia* 属であり、最大の類似性は 99–100%であったため、本実験に供した *Ramalina* spp.の共生藻は全て *Trebouxia* 属であると同定した。

### 5.3.2 地衣類を構成する真菌類の群集構造

3 個体の *Ramalina* 属からの真菌類の出現頻度および OTU 数について Table 5.3 に示した。地衣体 No. 18052604, No. 18052607 および No. 18052612 からは、それぞれ 20, 16 および 37 菌株が得られた。多くの真菌類が培養 2 週間以内に出現した。真菌類の出現頻度は MA 培地で 0–30%, MYA 培地で 3.2–60.9%であった。OTU 数は MA 培地で 0–6, MYA 培地で 1–8 であった。真菌類の出現頻度および OTU 数は、次亜塩素酸ナトリウム溶液の浸漬時間によって影響を受けなかったが、MA 培地よりも MYA 培地で増加する傾向にあった。No. 18052612 から得られた 3 株については PCR 増幅を確認できなかったため、以下の実験には含めなかった。出現した真菌類に酵母は含まれず、全て糸状形態の子囊菌 69 株、担子菌 1 株であった。計 70 株の nrITS 塩基配列から 97%の類似性に基づき、18 OTUs に分類した。各 OTU の分類学的所属および各標本からの出現数は、Table 5.4 および Fig. 5.2 にそれぞれ示した。全 3 標本から分離された菌株のうち、1 つの OTU は *Ramalina* sp.と同定されたが、地衣体から得られた真菌類由来の nrITS 塩基配列との類似性は 93–97%であり、どの地衣体の共生菌とも完全には一致しなかった。他の菌株は子囊菌門の 3 綱、Dothideomycetes (3 OTUs), Pezizomycetes (4 OTUs) および Sordariomycetes (9 OTUs) と担子菌門の Agaricomycetes (1 OTU) に属した。特に、*Nemania* spp.を含む Xylariaceae が最も優占する科であり (72.9%), OTU 数も最も高くなった。さらに *Nemania* spp.および Xylariaceae spp.は *Ramalina* 属の 3 標本全てから出現した。

### 5.3.3 菌体乾重量の比較

*Ramalina* 属から分離され、各 OTU から 1 株ずつ選抜した計 18 菌株と、*F. caperata* および *P. degenii* から分離された各 6 菌株は、*Pseudoplectania* sp. (Pezizomycetes) を除き、全てグルコースを炭素源とする LB 培地で生育した (Fig. 5.3 および Fig. 5.5)。菌株は、1 または 2 週間の培養で半数以上のプレートでコロニーがシャーレの縁まで達した場合は、その 1 週間後、つまり 2 または 3 週間後に培養を止めた。次に生育の早い菌株は、いくつかのコロニー (多くがグルコースを炭素源とする培地上で生育するコロニー) がシャーレの縁に達した場合に培養を止めた。コロニーがシャーレの縁に達しない菌株も最大 8 週間で培養を止めた。10 菌株 (Dothideomycetes, 1 株; Sordariomycetes, 8 株; Agaricomycetes, 1 株) は、リビトールまたはマンニトール添加区においてセルロース膜を分解していたため、正確な乾重量の測定は困難であった。これらについては Table 5.5 にまとめ、菌体乾重量は示さなかった。最も *Ramalina* 属の内生菌で優占していた *Nemania* sp. 1 もリビトールおよびマンニトール添加区においてセルロース膜を分解していた。他の 20 株においては、少なくとも炭素源添加区におけるセルロース膜の分解は見られなかった。菌体乾重量の有意差検定に基づき、炭素源の資化性を評価すると、*R. dilacerata* (No. 18052604) から出現した *Ramalina* sp. は、本実験で使用した 3 種類の炭素源 (グルコース、リビトールおよびマンニトール) を全て資化した (Fig. 5.3)。同様にリビトールおよびマンニトールを資化した菌は、共生菌と考えられる *Ramalina* sp. および LB 培地で良好な生育が見られなかった *Pseudoplectania* sp. を除く 18 株の内、10 株あった (*Sarea* sp. (Lecanoromycetes), *Acrodontium crateriforme*, *Sporormiella* sp. (Dothideomycetes), Pezizaceae sp. (Pezizomycetes), Sordariomycetes sp., Nectriaceae sp., *Annulohyphoxylon* sp., *Hypoxylon perforatum*, *Virgaria* sp. 1 および *Virgaria* sp. 3 (Sordariomycetes); Fig. 5.3 および Fig. 5.4A)。さらに 5 株 (*Plectania melastoma* (Pezizomycetes), *Nemania* sp. 2, *Virgaria* sp. 2, *Virgaria* sp. 4 および Xylariaceae sp. 5 (Sordariomycetes) はリビトールこそ資化しなかったものの、マンニトールを資化し

た。しかしながら、各ポリオールを資化する能力は、株によって差が見られた。ここで、*Ramalina* 属 3 個体それぞれから分離された菌株数とそれらが属する OTU の株が示した資化性によって推定される、各個体内で各炭素源の資化性を有する内生菌の割合を Fig. 5.4B に示した。その結果、リビトールを資化できる内生菌の割合は *Ramalina* 属 3 個体全てで最も低かった。対して、セルロース膜を分解する菌の割合は、3 個体全てで最も高かった。

#### 5.4 考察

第 2 章の結果と同様に、地衣化子嚢菌である *Ramalina* sp. はリビトールを炭素源として効率的に利用できた。リビトールはマンニトールへと変換されることが知られているため (Drew and Smith 1967, Richardson and Smith 1968a), リビトールと同様にマンニトールの資化性を有していたことにも矛盾はない。炭素源の資化性に基づき、内生菌を以下の 4 グループに分類した：(1) リビトールおよびマンニトールを資化できる菌；(2) マンニトールのみ資化できる菌；(3) リビトールおよびマンニトールを資化できない菌；(4) リビトールおよびマンニトールを含む培地であってもセルロース膜を分解した菌。

(1) のグループには *Sarea* sp. (Lecanoromycetes), *Acrodonium crateriforme*, *Sporormiella* sp. (Dothideomycetes), および Nectriaceae sp. (Sordariomycetes) などが含まれた。このグループに属する菌類のいくつかは、これまでに地衣類の内生菌としても報告がある (Li *et al.* 2007, U'Ren *et al.* 2016, Suryanarayanan *et al.* 2017, Lagarde *et al.* 2018)。一方で、多くは様々な基物に対する腐生菌として知られる。例えば、*Sarea* 属は松脂から腐生的に栄養を得ることが知られており (Hawksworth and Sherwood 1981), *Sporormiella* 属は最も一般的な糞生菌の一属である (Doveri 2011)。また、*A. crateriforme* はセルラーゼの一種であるセロビオヒドラーゼを生成する (Koukol and Baldrian 2012)。このように、このグループに属する菌類の多くは、ポリオールだけではなく、他の有機物も資化できると考えられる。それゆえ、これらの菌類は地衣類から他の宿主への移動が可能であると推測される。一方、リビトールは地衣類や緑藻類である Trebouxiophyceae の一部のクレードでは一般的なポリオールで

あるが (Gustavs *et al.* 2011), 陸上植物では, *Adonis vernalis* (Negm and Marlow 1985) と *Bupleurum* spp. (Oleznikov and Partilkhayev 2013) を除き, これまでに報告がない. よって, リビトールを資化できる能力は, 地衣内生菌や地衣寄生菌である場合に有用であると考えられる. これに関連して, Nectriaceae に含まれる *Nectria* 属には地衣寄生菌となる種も知られており (Diederich and Puntillo 1995), Nectriaceae に属する数種は地衣類への寄生や内生に適応し, 地衣体内でリビトールを利用していると考えられる. また, このグループに属する菌類は, *Ramalina* 属 3 個体における割合が低かったことから (Fig. 5.4B), 仮にこれらの菌類が, 地衣体内で緑藻が放出するリビトールを利用していたとしても, 共生菌に重大な影響がなかったと考えられる. しかしながら, 第 4 章で議論したポリオール輸送体同様, ポリオールを資化できる菌は地衣化しない分類群においても少なからず存在することが明らかとなった.

(2) のグループにも *Ramalina* spp. から 2 番目に高頻度で分離された *Nemania* sp. 2 (Sordariomycetes) を含む腐生菌として知られる菌類が多く属した. 地衣類は数年以上の長期間に渡り生育する生物であり, それゆえ, 十分に生長した個体ではその一部は枯死・分解し, マンニトールが菌糸から滲出している可能性がある. また, 内生菌はより古い地衣体を好むことも知られており (Honegger 2012), これらのことを踏まえると, このグループに属する菌類やグループ (1) に属し, 特にマンニトールを資化する能力の高い菌類は, 共生菌菌糸の一部が古くなり, 腐生的に分解されるのを待ってマンニトールを利用する腐生菌のような生態を持っているのではないかと考えられる. 一方, マンニトールは主に適合溶質として地衣類, 藻類および植物に遍在するポリオールである (Stoop *et al.* 1996, Iwamoto and Shiraiwa 2005). それゆえ, マンニトールを炭素源として利用する能力は自然界で生きる上で有益であり, 地衣類や植物を炭素源として利用できることを意味する. ただし, 共生菌にとってみれば, 合成したマンニトールを内生菌に利用されている可能性がある. しかしながら, 内生菌による完全な寄生を許さないのは二次代謝産物などによって防御しているからではないかと思われる. また, マンニトールを資化できる菌にはリビト



ールを資化できる菌類も存在したが、その逆は存在しなかったことから、リビトールはマンニトールよりも代謝系の上流に位置し、リビトールからマンニトールへ変換される代謝酵素は持っていない菌類がいるのではないかと推察される。

(3) のグループには Xylariaceae spp. (Sordariomycetes) および Pyronemataceae sp. (Pezizomycetes) が属した。これら菌類が地衣体内で何を炭素源としているかは明らかではないが、リビトールやマンニトール以外を炭素源として利用していると考えられる。(4) のグループには *Ramalina* spp. から最も高頻度で分離された *Nemania* sp. 1 を含む Xylariaceae spp. などが含まれた (Table 5.5)。Osono (2007) では、Xylariaceae はリグニン分解菌としてみなされている。また、このグループに属した他の菌類も落葉落枝などの木材腐朽菌として知られる。本実験で、このグループに属する菌類はポリオールよりもセルロースを好んだ。また、セルロースやリグニンはポリオールよりも自然界でより獲得しやすい炭素源であると考えられる。さらに、Xylariaceae は様々な地衣類 (Suryanarayanan *et al.* 2017, Lagarde *et al.* 2018) や木本植物の葉 (Osono *et al.* 2013)、苔類 (Davis *et al.* 2003) から内生菌としても分離され、ゆえにその宿主特異性は低いと言える。そして、このグループが *Ramalina* 属 3 個体における割合が最も高かったにも関わらず (Fig. 5.4B)、地衣体には目に見える病徴や傷害はなかった。これらの理由から、本グループの Xylariaceae は地衣体に一時的に滞在している木材腐朽菌なのではないかと考えられる。また、このグループに限らないが、分離された内生菌には滅菌処理に耐性があると思われる胞子を持つ菌類も存在した。例えば、Xylariaceae の仲間は褐色から暗褐色の胞子を作り (Rogers *et al.* 2008, Wendt *et al.* 2018)、*Plectania melastoma* の胞子も黒ずんでいて、細かいいぼ状の突起を持ち、時にゼラチン質の鞘で覆われる (Carbone *et al.* 2015)。また、*Sporormiella* 属は黒く厚い壁を持った分散型の胞子を作ることでも知られる (Doveri 2011)。したがって、これらの菌類は一時的に地衣体に付着してただけであっても、*Ramalina* spp. から分離されてしまう場合があると考えられる。Fernández-Mendoza *et al.* (2017) は培養に基づく実験では Xylariaceae が属する Sordariomycetes は内生菌としてよく得られるが、メタバーコーディングで得られることは

非常に稀であると報告している。すなわち、胞子のみで存在しているのであれば、存在量が少なく、また耐性を持つために PCR による増幅を受けにくいのではないかと考えられる。

*Ramalina* spp., *Flavoparmelia caperata* および *Peltigera degenii* から分離された内生菌の中にはリビトールの資化性を有する株も存在した。それゆえ、共生藻による内生菌のポリオール資化性の違いは確認されなかった。一方、これまでの考察で述べたように、分離された内生菌の中には、宿主特異性が低く、様々な基物を炭素源として利用していると推定される菌類も多く存在した。そのため、*P. degenii* の内生菌についても、緑藻を共生藻とする地衣類から移動してきた宿主特異性の低い菌類であった可能性がある。

*Ramalina* spp., *F. caperata* および *P. degenii* から分離された内生菌 29 株の内、マンニトールを資化できた株は 15 株、リビトールを資化できた株は 10 株であり、地衣内生菌は少なからずポリオールを資化できることが分かった。しかしながら、資化能力の高さにはばらつきあり、特に地衣化子嚢菌のようにグルコースと同程度にリビトールおよびマンニトールを資化できる菌は限られていた。また、ポリオールの資化能力は特定の分類群に存在するのではなく、種によっても変わることが分かった。これらのことから、ポリオール資化能力は地衣化子嚢菌だけではなく、地衣内生菌においても保持している場合が多いが、その能力には差があると考えられる。

Arnold *et al.* (2009) は、*Umbilicaria mammulata* を用いた実験において、菌糸の層である髄層や表皮層よりも藻類層で、より多くの内生菌が分離されると報告した。一方、Spribille *et al.* (2016) は、*Bryoria* spp. を用いた実験において、表皮層に特異的な酵母様担子菌類が包埋されていることを報告した。また、地衣類では共生菌由来と考えられる  $\alpha$ -グルカンや  $\beta$ -グルカン、ガラクトマンナンなどの多糖類の存在も知られており (Olafsdottir and Ingólfssdottir 2001)、特に、地衣化する子嚢菌類は多量のグルカンを含んだ非常に厚い細胞壁を持つ (Honegger 2012)。したがって、表皮層、髄層および藻類層では存在する炭素源も異なると考えられ、炭素源の資化性と合わせ、内生菌の生存場所とを明らかにすることで、

内生菌の生態がより鮮明になると思われる。

本実験において、腐生や寄生など様々な生態が知られている、子囊菌門のいくつかの科や綱に属する内生菌を分離し、炭素源の資化性により4つに分類した。このような炭素源資化性の違いは、内生菌の様々な炭素源獲得様式の多様性を生み、地衣体内での炭素源の食い分けにつながっていると考えられる。今後、炭素源をどのように、またどこから得るかを明らかにすることで、内生菌と共生菌または内生菌と共生藻との相互作用や、内生菌の地衣体内での役割が明らかになると考えられる。

## 5.5 要約

地衣化子囊菌類と同様に、地衣体に内生する子囊菌類についてもポリオールを資化性を有しているという仮説を立て、*Ramalina conduplicans*, *R. dilacerata*, *Flavoparmelia caperata* および *Peltigera degenii* から内生菌を分離し、ポリオールの資化性を試験した。特に *R. conduplicans* 1個体、*R. dilacerata* 2個体からは計70株分離し、18 OTUs (Operational Taxonomic Units) に分類した。各 OTU から1株ずつ、*Flavoparmelia caperata* および *Peltigera degenii* から分離された6株ずつを用い、グルコースまたはリビトール、マンニトールを炭素源として添加した区と炭素源無添加区を設けて培養した。この内1株は *Ramalina* sp. と同定されたため、地衣化子囊菌であると考えられ、グルコースと同程度にリビトールおよびマンニトールを資化した。内生菌29株のうちマンニトールを資化できた株は15株、リビトールを資化できた株は10株であった。マンニトールとリビトールの両方を資化する菌は試験した子囊菌門4綱の全てで見られた。一方、同じ属と同定された OTU 間においてもポリオールの資化性の有無に違いがあったことから、ポリオールの資化性は種レベルで変化すると推測される。さらにリビトールを資化できる菌は全てマンニトールも資化することができたため、リビトールはマンニトールよりも代謝系の上流に位置しているのではないかと考えられる。本実験により、地衣化子囊菌以外にもポリオールを唯一の炭素源として生育できる子囊菌が少なからず存在することが明らかとなった。

Table 5.1 Collected *Ramalina* lichen samples

Species	Specimen ID			GenBank no.	
	(after K. Yoshino)	CBM* no.	Growing on	Fungal ITS	Algal ITS
<i>R. dilacerata</i>	18052604	FL-205118	trunk of <i>Cornus controversa</i>	LC431557	LC431560
<i>R. conduplicans</i>	18052607	FL-205119	trunk of <i>Larix kaempferi</i>	LC431558	LC431561
<i>R. dilacerata</i>	18052612	FL-205120	trunk of Betulaceae	LC431559	LC431562

\*Herbarium of the Natural History Museum and Institute, Chiba, Japan

Table 5.2 Lilly and Barnett's medium

Carbon source	20.0 g
Asparagine*	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.2 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 mg
Thiamine	0.1 mg
Biotin	5.0 µg
Distilled water	1.0 L

\*Used L-Asparagine Monohydrate 2.273 g in this study

Table 5.3 Isolation frequency of surface pasteurized *Ramalina* spp.

Specimens (ID after K. Yoshino)	Immersing in NaClO (min)	MA			MYA		
		Isolations /segments	Rate (%)	OTU* no.	Isolations /segments	Rate (%)	OTU* no.
<i>R. dilacerata</i> (18052604)	1	8/57	14.0	6	11/51	21.6	8
	2	0/53	0.0	0	1/31	3.2	1
<i>R. conduplicans</i> (18052607)	1	2/72	2.8	2	4/88	4.5	2
	2	3/49	6.1	3	7/58	12.1	4
<i>R. dilacerata</i> (18052612)	1	7/33	21.2	3	7/39	17.9	6
	2	9/30	30.0	5	14/23	60.9	8

\*OTU was defined as ITS sequence identities >97%

Table 5.4 Identification of each OTU isolate from *Ramalina* spp. used assimilation tests based on nrITS sequences

OTU	Culture ID and NBRC no. (GenBank no.)	Estimated classifications	References Type specimens or reliable vouchers/strains	Identities	
				GenBank no.	bp (%)
<b>Ascomycota</b>					
<b>Dothideomycetes</b>					
<b>Capnodiales</b>					
<b>Teratosphaeriaceae</b>					
1	MA04S08 NBRC 113719 (LC431563)	<i>Acrodontium crateriforme</i>	<i>Acrodontium crateriforme</i> (type) <i>Acrodontium crateriforme</i> ATCC 15679	NR_152320.1 MF951410.1	458/459 (99) 478/479 (99)
<b>Pleosporales</b>					
<b>Periconiaceae</b>					
2	MYA04S03 NBRC 113723 (LC431564)	<i>Periconia</i> sp.	<i>Periconia macrospinoso</i> KS00113  <i>Periconia macrospinoso</i> CBS 135663 <i>Periconia igniaria</i> CBS 379.86	FJ536208.1  KP183999.1 LC014585.1	567/581 (98)  512/526 (97) 513/515 (99)
3	MA0702 NBRC 113720 (LC431565)	<b>Sporormiaceae</b> <i>Sporormiella</i> sp.	<i>Preussia cymatomera</i> CBS 396.81 (current name: <i>Sporormiella cymatomera</i> ) <i>Preussia pilosella</i> S38 (current name: <i>Sporormiella pilosella</i> )	KX710252.1 DQ468033.1	513/518 (99) 466/468 (99)
<b>Lecanoromycetes</b>					
<b>Lecanorales</b>					
<b>Ramalinaceae</b>					
4	MYA0401 (LC431566)	<i>Ramalina</i> sp.	<i>Ramalina calicaris</i> <i>Ramalina confirmata</i> <i>Ramalina conduplicans</i> <i>Ramalina sphaerophora</i> (type)	JF923607.1 JF923606.1 JF923600.1 KT698285.1	779/807 (97) 775/810 (96) 770/806 (96) 726/782 (93)
<b>Pezizomycetes</b>					
<b>Pezizales</b>					
<b>Pezizaceae</b>					
5	MYA12S01 NBRC 113727 (LC431567)	<i>Pezizaceae</i> sp.	<i>Peziza ampelina</i> KH 00.011 <i>Peziza varia</i> KH-99-04 <i>Peziza oliviae</i> (type) <i>Peziza nordica</i> (type)	AF491629.1 AF491558.1 NR_148069.1 NR_148104.1	579/659 (88) 367/424 (87) 569/660 (86) 554/646 (86)

6	MYA0701 NBRC 113730 (LC431568)	<b>Pyronemataceae</b> Pyronemataceae sp.	Fungal sp. ARIZ AZ0277 (probably belonging to sister clade of <i>Wilcoxina</i> in Tedersoo and Smith 2013) <i>Tricharina praecox</i> var. <i>praecox</i> (Pyronemataceae, <b>type</b> ) <i>Geopora cercocarpi</i> (Pyronemataceae, <b>type</b> )	HM123025.1 NR_103690.1 NR_121491.1	571/571 (100) 519/628 (83) 399/475 (84)	Tedersoo and Smith (2013)
7	MYA04S02 NBRC 113722 (LC431569)	<b>Sarcosomataceae</b> <i>Plectanania melastoma</i>	<i>Plectanania melastoma</i> voucher F. Lommer - 20-04-2016-2 <i>Plectanania melastoma</i> voucher TUR-A 195783 <i>Plectanania zugazae</i> voucher TUR-A 199785 <i>Plectanania zugazae</i> ( <b>type</b> ) <i>Pseudoplectanania nigrella</i> ( <b>type</b> )	MF000911.1 JX669805.1 KM610322.1 NR_120217.1 NR_120216.1	655/663 (99) 474/480 (99) 579/612 (95) 452/481 (94) 490/510 (96)	Carbone <i>et al.</i> (2015) Carbone <i>et al.</i> (2015)
8	MYA04S08 NBRC 113724 (LC431570)	<i>Pseudoplectanania</i> sp.				
9	MYA1205 (LC431571)	<b>Sordariomycetes</b> <b>Coniochaetales</b> <b>Coniochaetaceae</b> <i>Coniochaeta cipronana</i>	<i>Coniochaeta cipronana</i> ( <b>type</b> ) <i>Coniochaeta navarrae</i> ( <b>type</b> )	NR_157478.1 NR_154808.1	585/593 (99) 577/597 (97)	Coronado-Ruiz <i>et al.</i> (2018)
10	MA04S01 NBRC 113718 (LC431572)	<b>Sordariales</b> <b>Lasiosphaeriaceae</b> <i>Cercophora</i> sp.	<i>Cercophora coprophila</i> IFO 32091 <i>Cercophora grandiuscula</i> CBS 120013 <i>Cladorrhinum microsclerotigenum</i> (Lasiosphaeriaceae, <b>type</b> ) <i>Cercophora samala</i> (Lasiosphaeriaceae, <b>type</b> ) <i>Cercophora thailandica</i> ( <b>type</b> )	AY999136.1 GQ922544.1 FN662475.1 GQ922521.1 KU940139.1	577/577 (100) 531/543 (98) 520/579 (90) 488/547 (89) 311/350 (89)	Geydan <i>et al.</i> (2012)
11	MA1204 NBRC 113721 (LC431573)	<b>Xylariales</b> <b>Xylariaceae</b> <i>Nemanzia</i> sp. 1	<i>Nemanzia abortiva</i> ( <b>type</b> )	NR_121350.1	558/637 (88)	
12	MYA07S01 NBRC 113726 (LC431574)	<i>Nemanzia</i> sp. 2	<i>Nemanzia abortiva</i> ( <b>type</b> )	NR_121350.1	552/632 (87)	
13	MYA0703 NBRC 113731 (LC431575)	Xylariaceae sp. 1	<i>Entalbostroma erumpens</i> (Xylariaceae, <b>type</b> ) <i>Chyposphaeria mamillana</i> (Xylariaceae, <b>type</b> )	NR_154013.1 NR_153909.1	524/617 (85) 504/598 (84)	
14	MYA04S09 NBRC 113725 (LC431576)	Xylariaceae sp. 2	<i>Entalbostroma erumpens</i> (Xylariaceae, <b>type</b> ) <i>Anthostomella brabeji</i> (Xylariaceae, <b>type</b> )	NR_154013.1 NR_153509.1	524/622 (84) 531/639 (83)	

15	MYA1202 NBRC 113732 (LC431577)	Xylariaceae sp. 3	<i>Nemania abortiva</i> ( <b>type</b> ) <i>Anthostomella leucospermi</i> (Xylariaceae, <b>type</b> )	NR_121350.1 NR_153510.1	562/627 (90) 553/616 (90)
16	MYA12S04 NBRC 113728 (LC431578)	Xylariaceae sp. 4	<i>Anthostomella brabeji</i> (Xylariaceae, <b>type</b> ) <i>Barrmaelia rhannicola</i> (Xylariaceae, <b>type</b> )	NR_153509.1 NR_153497.1	521/645 (81) 513/638 (80)
17	MYA1214 NBRC 113733 (LC431579)	Xylariaceae sp. 5	<i>Clypeosphaeria mamillana</i> (Xylariaceae, <b>type</b> ) <i>Anthostomella proteae</i> (Xylariaceae, <b>type</b> ) <i>Xylaria brunneovinosa</i> (Xylariaceae, <b>type</b> )	KT949897.1 EU552101.1 EU179862.1	412/444 (93) 418/462 (90) 402/446 (90)
		<b>Basidiomycota</b>			
		<b>Agaricomycetes</b>			
		<b>Polyporales</b>			
		<b>Meruliaceae</b>			
18	MYA12S07 NBRC 113729 (LC431580)	<i>Emmia lacerata</i>	<i>Ceriporia lacerata</i> SFFPS MZ-340 (current name: <i>Emmia lacerata</i> , <b>type</b> ) <i>Flavodon ambrosius</i> ( <b>type</b> )	AB091675.1 NR_154000.1	571/571 (100) 634/670 (95)

Table 5.5 Cellulose-decomposing Fungi

---

Classifications (incubation weeks)

---

**Ascomycota**

**Dothideomycetes, Pleosporales, Periconiaceae**

*Periconia* sp. (3)

**Sordariomycetes, Boliniales, Boliniaceae**

*Pseudovalsaria* sp.<sup>\*1</sup> (7)

**Coniochaetales, Coniochaetaceae**

*Coniochaeta cipronana* (4)

**Sordariales, Lasiosphaeriaceae**

*Cercophora* sp. (2)

**Xylariales, Graphostromataceae**

*Biscogniauxia* sp. 1<sup>\*1</sup> (2)

*Biscogniauxia* sp. 2<sup>\*2</sup> (2)

**Xylariaceae**

*Nemania* sp. 1 (4)

Xylariaceae sp. 3 (3)

Xylariaceae sp. 4 (3)

**Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporales, Meruliaceae**

*Emmia lacerata* (2)

---

<sup>\*1</sup> Isolated from the thallus of *Flavoparmelia caperata*

<sup>\*2</sup> Isolated from the thallus of *Peltigera degenii*





Fig. 5.1 Lichen specimens collected: (A) *Ramalina dilacerata* (K. Yoshino 18052604), (B) *R. conduplicans* (K. Yoshino 18052607), and (C) *R. dilacerata* (K. Yoshino 18052612).

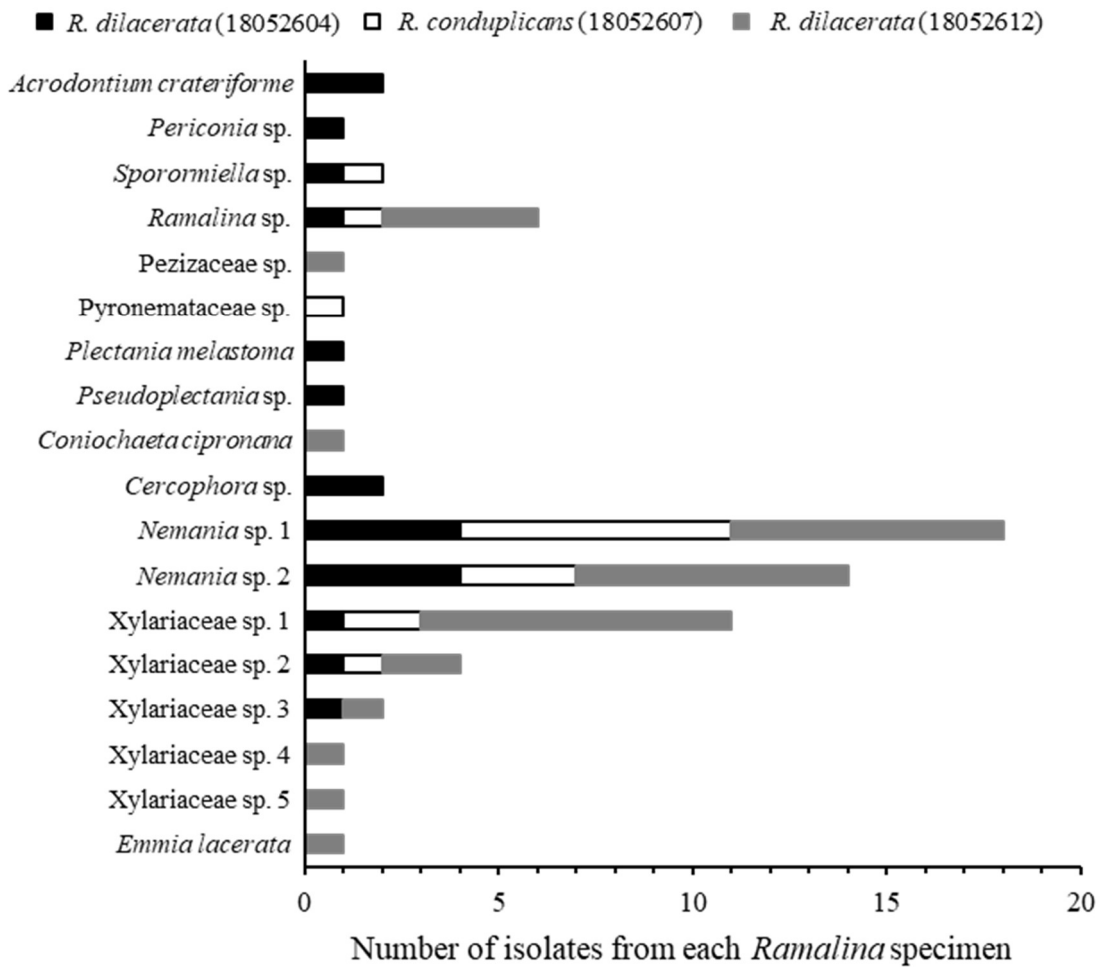


Fig. 5.2 Number of OTU isolates from each *Ramalina* specimen (ID after K. Yoshino)

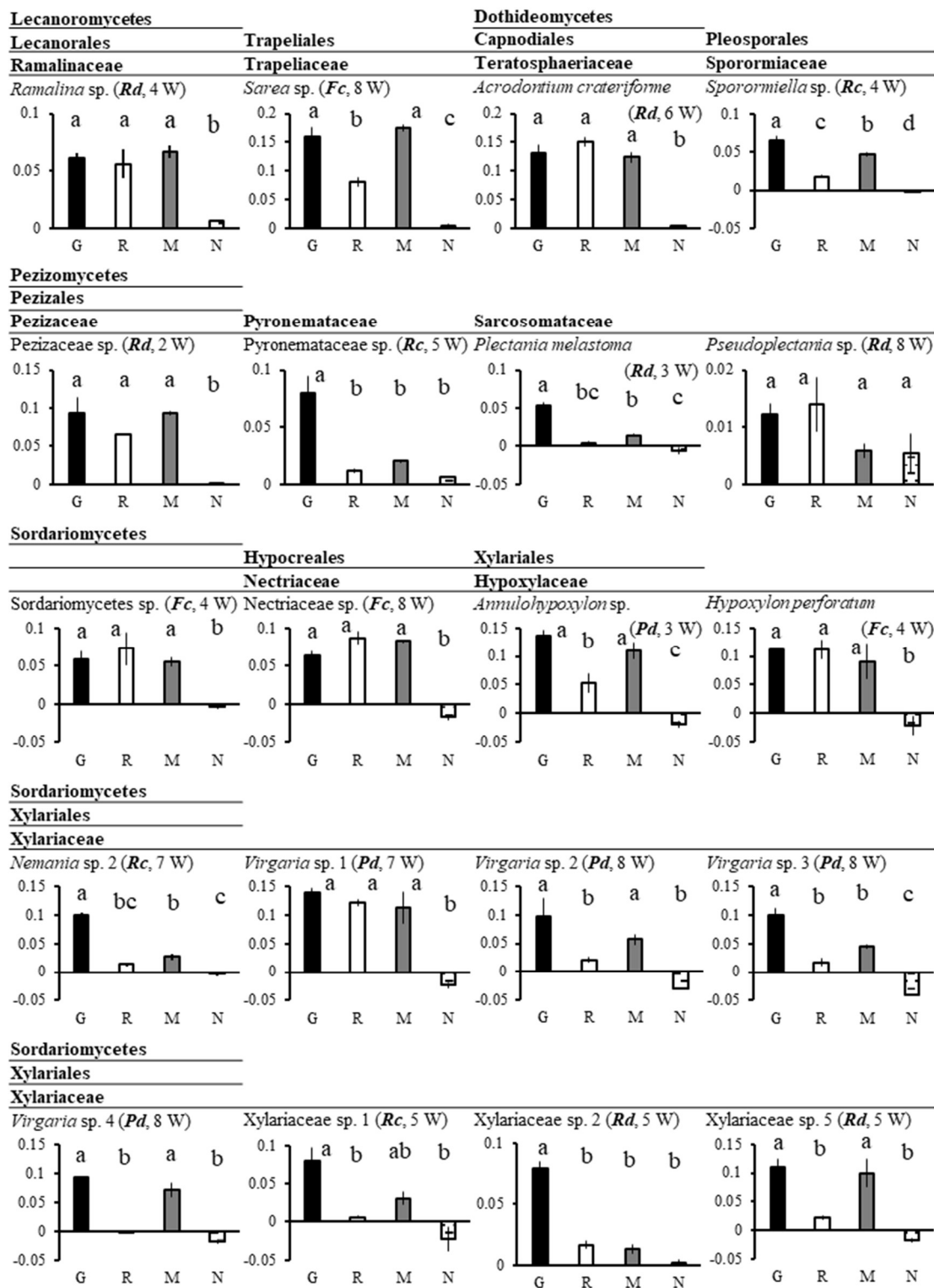
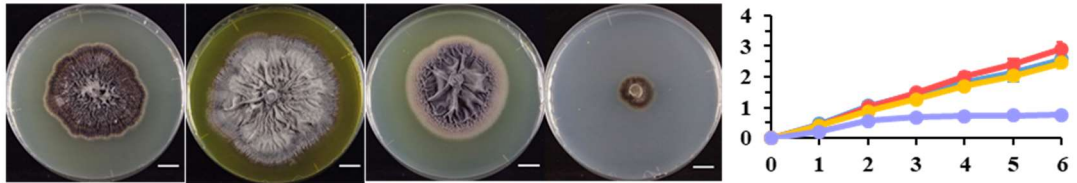


Fig. 5.3 Fungal dry weights (g) in the testing of polyol assimilation. Abbreviations: G = glucose, R = ribitol, M = mannitol, N = non-carbon source, *Fc* = *Flavoparmelia caperata*, *Rc* = *Ramalina conduplicans*, *Rd* = *Ramalina dilacerata*, *Pd* = *Peltigera degenii*, W = incubation weeks. Individual letters (a, b, c, and d) denote significant differences based on the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ). Standard errors ( $n = 3$ ) have also been shown in the bar graphs. Some isolates decomposed the cellulose filter on media without carbon source (N).

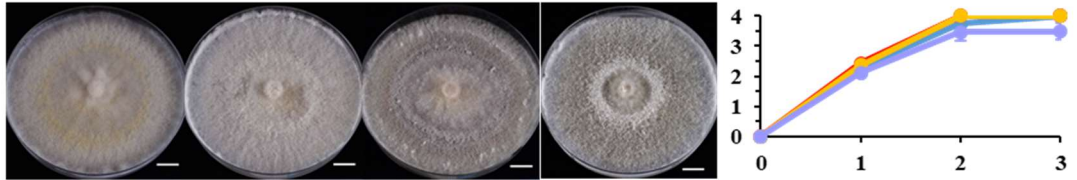
	Glucose+ Mannitol+ Ribitol+	Glucose+ Mannitol+	Glucose+	Cellulose+
(A)				
<i>Ramalina</i> spp.	3	3	3	7
<i>Flavoparmelia caperata</i>	4	—	—	2
<i>Peltigera degenii</i>	3	2	—	1
(B)				
<i>R. dilacerata</i> (18052604)	3	5	2	8
<i>R. conduplicans</i> (18052607)	1	3	4	7
<i>R. dilacerata</i> (18052612)	1	8	10	11

Fig. 5.4 Distribution of lichen-inhabiting fungi grouped by the ability of carbon assimilation. (A) Distribution of isolates used polyol assimilation test. Isolates of *Ramalina* spp. were consisted representative strain from each OTU isolate (Table 5.4), except for *Ramalina* sp. and *Pseudoplectania* sp. Because *Ramalina* sp. is considered as its mycobiont and *Pseudoplectania* sp. did not well grow on Lilly and Barnett's medium containing glucose, namely positive control. The white circles, *Ramalina* spp.; grey circles, *Flavoparmelia caperata*; black circles, *Peltigera degenii*. (B) Estimating the proportion of lichen-inhabiting fungi in each thallus of *Ramalina* spp. (ID after K. Yoshino) calculated by distribution of each OTU isolate (Fig. 5.4A) and the actual number of isolates from each specimen (Fig. 5.2).

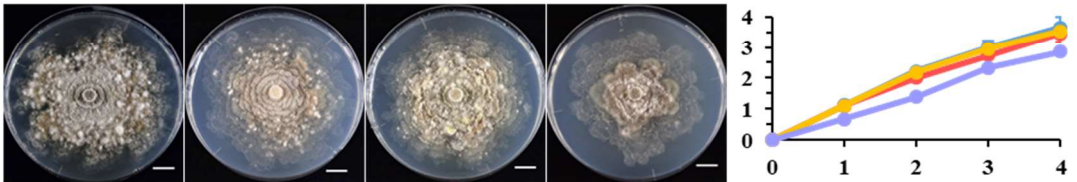
*Acrodontium crateriforme* (MYA04S08, **Group 1**, Dothideomycetes, Capnodiales, Teratosphaeriaceae)



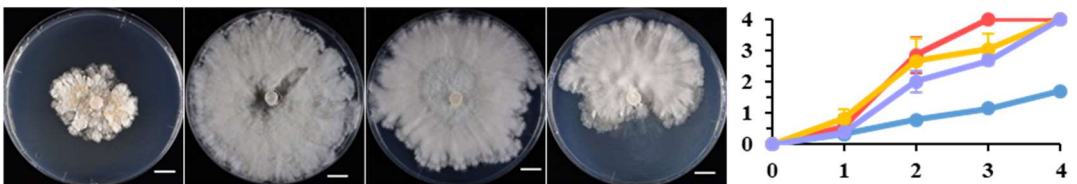
*Periconia* sp. (MYA04S03, **Group 4**, Dothideomycetes, Pleosporales, Periconiaceae)



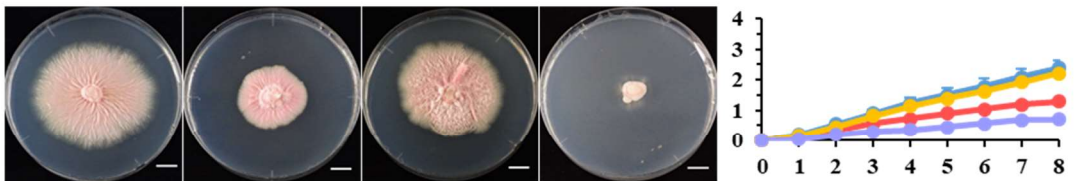
*Sporormiella* sp. (MA0702, **Group 1**, Dothideomycetes, Pleosporales, Sporormiaceae)



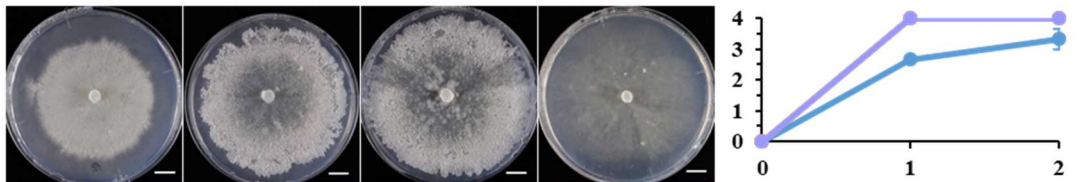
*Ramalina* sp. (MYA0401, **Group 1**, Lecanoromycetes, Lecanorales, Ramalinaceae)



*Sarea* sp. (HMF-077, **Group 1**, Lecanoromycetes, Trapeliales, Trapeliaceae)

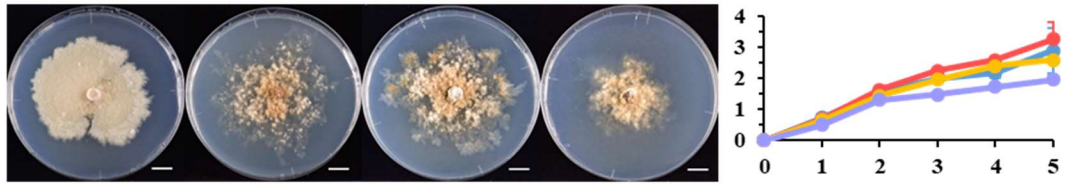


*Pezizaceae* sp. (MYA12S01, **Group 1**, Pezizomycetes, Pezizales, Pezizaceae)

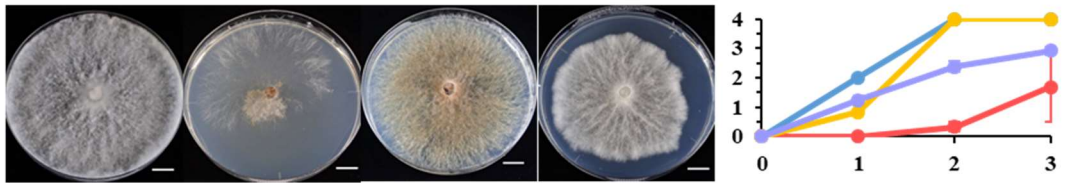




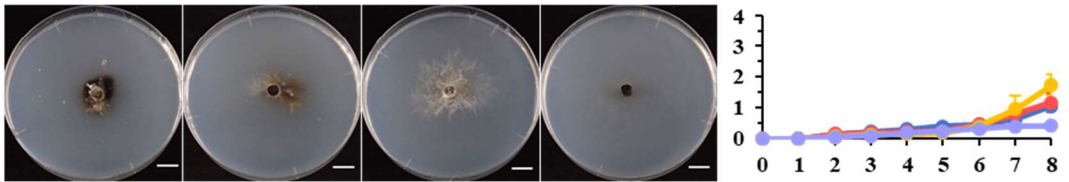
**Pyronemataceae sp. (MYA0701, Group 3, Pezizomycetes, Pezizales, Pyronemataceae)**



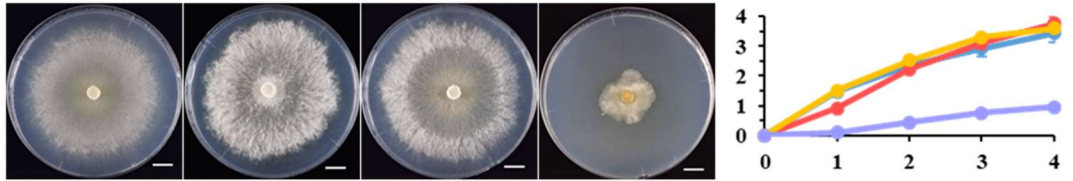
**Plectania melastoma (MYA04S02, Group 2, Pezizomycetes, Pezizales, Sarcosomataceae)**



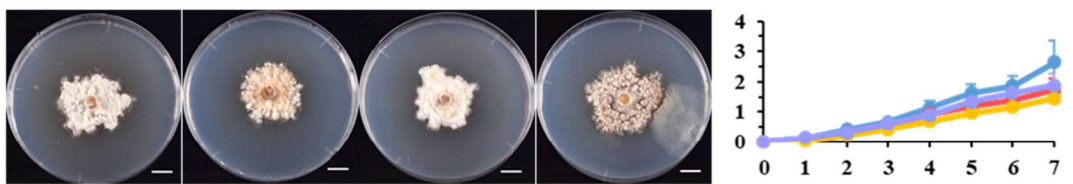
**Pseudoplectania sp. (MYA04S08, Pezizomycetes, Pezizales, Sarcosomataceae)**



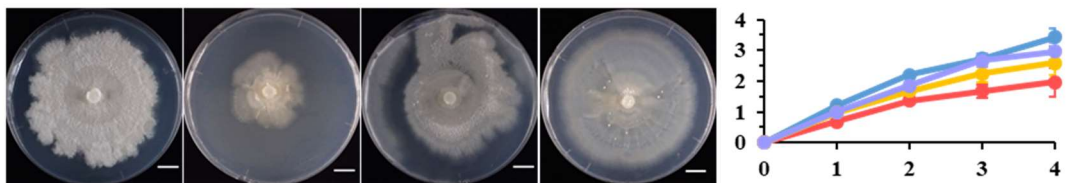
**Sordariomycetes sp. (HMF-071, Group 1, Sordariomycetes)**



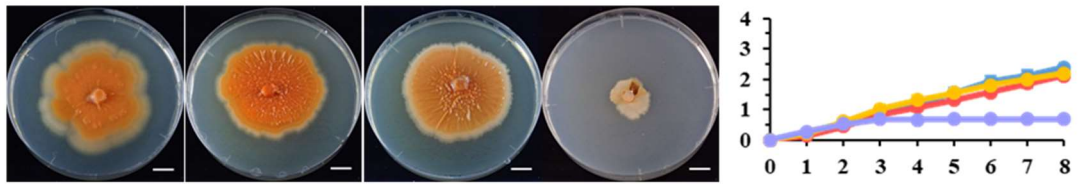
**Pseudovalsaria sp. (HMF-072, Group 4, Sordariomycetes, Boliniales, Boliniaceae)**



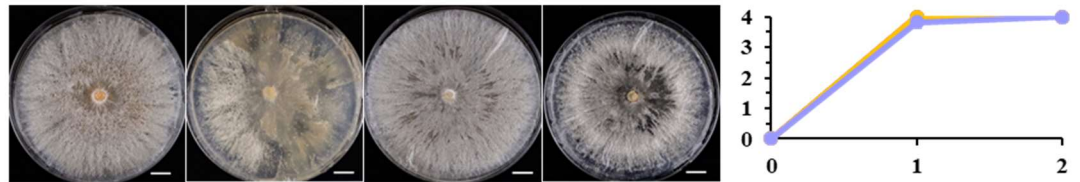
**Coniochaeta cipronana (MYA1205, Group 4, Sordariomycetes, Coniochaetales, Coniochaetaceae)**



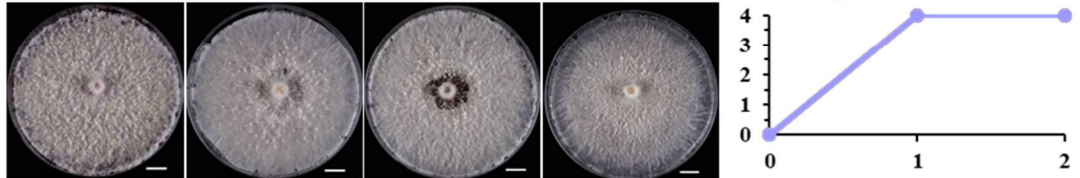
*Nectriaceae* sp. (HMF-075, **Group 1**, Sordariomycetes, Hypocreales, Nectriaceae)



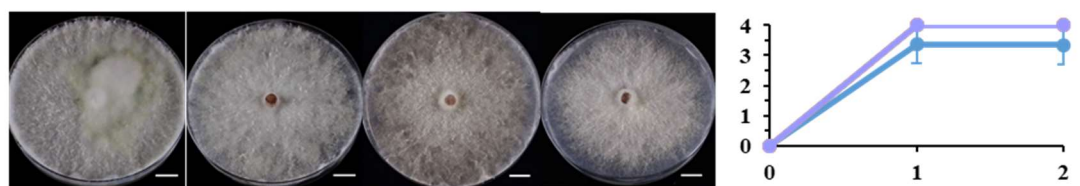
*Cercophora* sp. (MA04S01, **Group 4**, Sordariomycetes, Sordariales, Lasiosphaeriaceae)



*Biscogniauxia* sp. 1 (HMF-078, **Group 4**, Sordariomycetes, Xylariales, Graphostromataceae)



*Biscogniauxia* sp. 2 (HMF-083, **Group 4**, Sordariomycetes, Xylariales, Graphostromataceae)



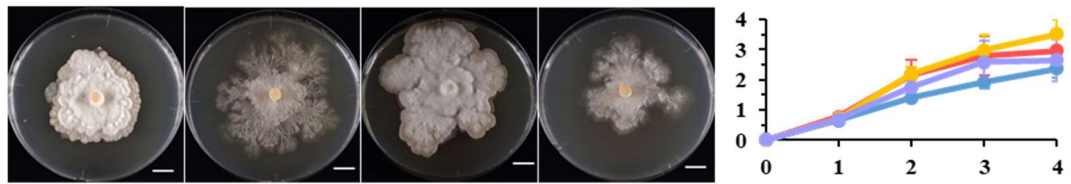
*Annulohypoxyton* sp. (HMF-082, **Group 1**, Sordariomycetes, Xylariales, Hypoxylaceae)



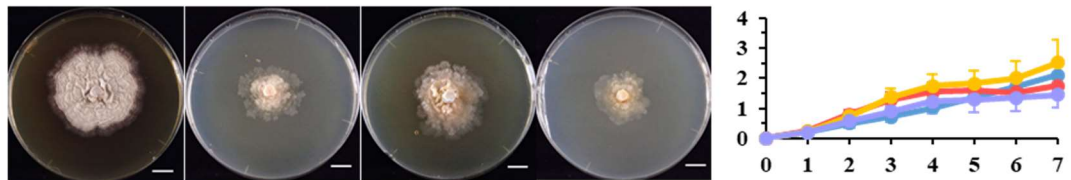
*Hypoxyton perforatum* (HMF-076, **Group 1**, Sordariomycetes, Xylariales, Hypoxylaceae)



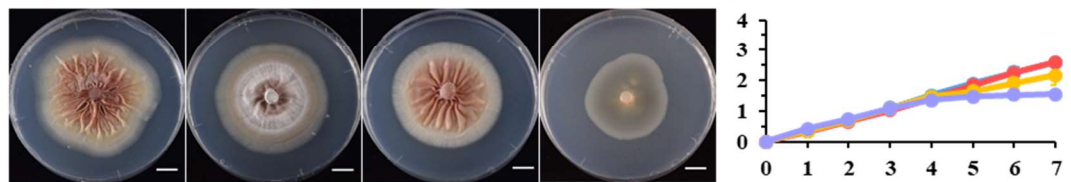
*Nemania* sp. 1 (MA1204, **Group 4**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



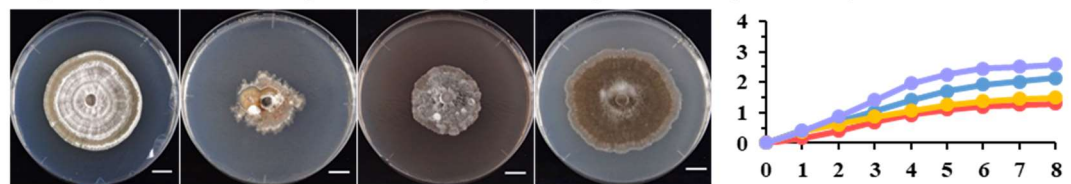
*Nemania* sp. 2 (MYA07S01, **Group 2**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



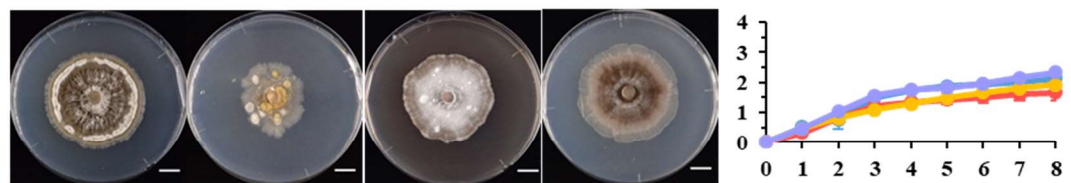
*Virgaria* sp. 1 (HMF-080, **Group 1**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



*Virgaria* sp. 2 (HMF-081, **Group 2**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



*Virgaria* sp. 3 (HMF-084, **Group 1**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)

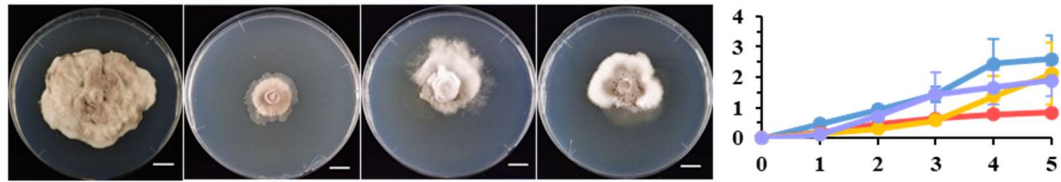


*Virgaria* sp. 4 (HMF-090, **Group 2**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)

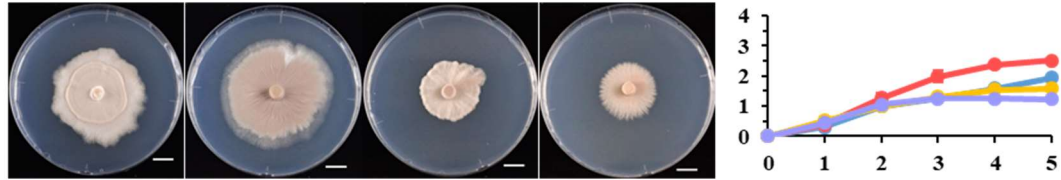




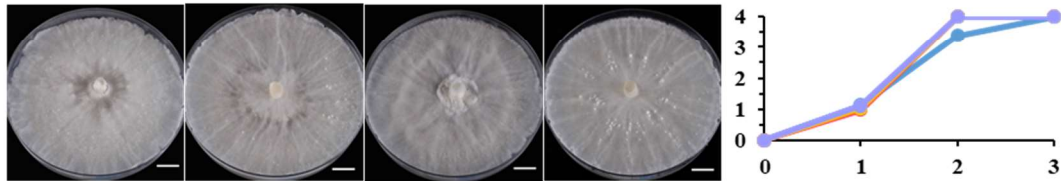
**Xylariaceae sp. 1** (MYA0703, **Group 3**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



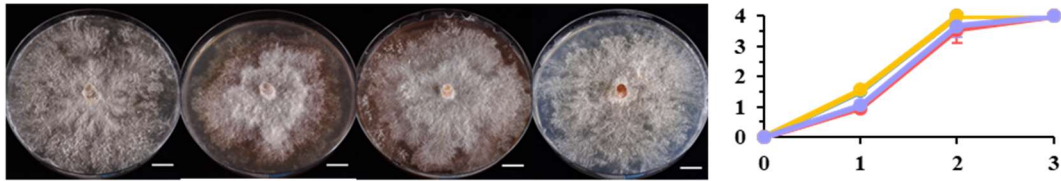
**Xylariaceae sp. 2** (MYA04S09, **Group 3**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



**Xylariaceae sp. 3** (MYA1202, **Group 4**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



**Xylariaceae sp. 4** (MYA12S04, **Group 4**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



**Xylariaceae sp. 5** (MYA1214, **Group 2**, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae)



**Emmia lacerata** (MYA12S07, **Group 4**, Agaricomycetes, Polyporales, Meruliaceae)

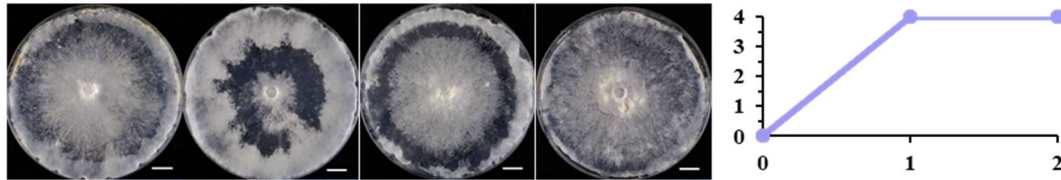


Fig. 5.5 Culture photos before drying and sequential hyphal lengths per week. Scale bar = 1 cm. Photos show cultures grown on media containing glucose, ribitol, mannitol, and non-carbon sources, from left to right. Graphs show hyphal lengths (longitudinal axis) and incubation weeks (horizontal axis). Graph legends: blue line, cultures grown on media containing glucose; red line, ribitol; orange line, mannitol; purple line, non-carbon sources.



## 第6章 総合考察

子囊菌類を始めとする真菌類におけるポリオール輸送や代謝に関する研究は、これまで植物における研究などと比べると著しく遅れていた。しかしながら、子囊菌酵母におけるポリオール輸送体の相次ぐ発見や (Pereira *et al.* 2014, Londesborough *et al.* 2014, Jordan *et al.* 2016), ポリオールの多様な機能ならびに代謝酵素の報告が続いており (Patel and Williamson 2016), 真菌類におけるポリオールの重要性が認識され始めていると言える。真菌類においては、アメリカのエネルギー省などが進める 1000 Fungal Genomes project (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) やゲノムシーケンスの価格低下によって、幅広い分類群のゲノム情報基盤が築かれつつある。しかしながら、約10億種記載されている真菌類のうち、これまでにポリオール輸送体 (polyol transporter) とアノテーションされる遺伝子は2019年1月5日現在でも GenBank で180件しかなく、種数ではさらに少ない。さらにリビトール輸送体 (ribitol transporter) で検索すると子囊菌類の *Beauveria bassiana* の遺伝子一件しかヒットしない (この遺伝子はバクテリアのポリオール輸送体と類似性が高いが、子囊菌酵母のポリオール輸送体とは全く類似していない)。これは既知のポリオール輸送体遺伝子が単糖輸送体遺伝子などと同じドメインを持っており、類似性も高く、単糖輸送体の方がより多くの種で同定されていることから、仮にポリオール輸送体であったとしても単糖輸送体などとアノテーションされている可能性が高いためであると考えられる。ポリオール輸送体については、第4章において分子系統解析により、子囊菌類全体での保存性を明らかにした。それによって、これまでに報告されたポリオール輸送体は、単糖輸送体とは異なる3つのクレードに属することが分かった。さらにその内2つのクレードには、子囊菌門のほぼ全ての分類系統から選抜した推定ポリオール輸送体が属した。つまり、子囊菌類では少なくとも2系統のポリオール輸送体遺伝子を高く保存していることが示された。しかしながら、ポリオール輸送体は類似性の非常に高いタンパク質間においても輸送可能な物質が異なることが報告されており (Pereira *et al.* 2014, Jordan *et*

al. 2016), 推定ポリオール輸送体の輸送物質についても慎重に吟味していく必要がある。

子囊菌類におけるポリオールの炭素源としての利用については、これまでほとんど知られていなかったが、第5章において子囊菌門の4綱に属する菌類が、ポリオールの内、リビトールおよびマンニトールを唯一の炭素源として旺盛に生育することを示した。しかしながら、地衣類に内生している子囊菌類であり、かつポリオールの資化性を有する菌と同属と推定される菌類であってもポリオールの資化性を持たない場合が多々あり、特に多くがリビトールの資化性を失っていた。リビトールは自然界において地衣類や一部の気生藻が保持しているが (Roser *et al.* 1992, da Silva *et al.* 1993, Gaio-Oliveira *et al.* 2005, Gustavs *et al.* 2011), 植物では非常に限られた属でしか保持しておらず (Negm and Marlow 1985, Olennikov and Partilkaev 2013), マンニトール多くと比べると存在量が圧倒的に少ないと考えられる。また、第1章の Fig. 1.1 (Lines *et al.* 1989) で示した地衣化子囊菌におけるリビトールからマンニトールへの合成経路や、第5章においてリビトールを資化できる菌は必ずマンニトールも資化できたがその逆は成り立たなかった結果から、地衣化子囊菌のみならず、子囊菌類ではリビトールはマンニトールよりも代謝系の上流に位置すると考えられる。すなわち、リビトールを炭素源やエネルギー源として利用することがなかった種では、リビトールを出発点とする上流の代謝系を失っているのではないかと考えられる。一方で、マンニトールの代謝系については、リビトールよりも利用価値が高かったためにより多くの種で保存されていたと推察される。先に述べたポリオール輸送体についても、このようなポリオール間での差があると考えられ、保存されている多くのポリオール輸送体はリビトールよりもマンニトールなどのポリオールを輸送するのかもしれない。

地衣化子囊菌類の多くは緑藻を共生藻としており (Honegger 2012), それら緑藻から供給されるポリオールを利用して生育している。ゆえに、地衣化子囊菌類にとって、緑藻からのポリオールの供給は共生する最大のメリットであり、共生関係を維持するための最重要機構と考えられる。しかしながら、ポリオールの輸送については、1960-1980年代に放射性または安定同位体を用いた一連の研究以降 (Smith 1968 から Lines *et al.* 1989), 大きく

進展してこなかった。これは真菌類におけるポリオール輸送や代謝に関する研究が進んでいなかったことや、また地衣類の培養に関する技術的、時間的な問題を有していたことが原因と考えられる。そこで本研究では、ポリオール輸送や代謝に関する研究を進める上でモデルと成り得る地衣類として *Ramalina conduplicans* を選び、研究を進めた。まず第 2 章では、*R. conduplicans* から共生菌 KY1401 株を分離し、最適な合成培地の検討と炭素源としてのリビトールおよびスクロースの影響を比較した。それにより、*R. conduplicans* KY1401 はリビトールやスクロースを唯一の炭素源として生育でき、かつリビトールでより高い生長率を示すことが分かった。また第 5 章で用いた *Ramalina* sp. についても同様の結果が得られた。これまでも地衣化子嚢菌類の培養におけるポリオールの添加実験は行われてきたが、他の炭素源を含むことが多く (Yamamoto *et al.* 1985, Wang *et al.* 2009, Meeßen *et al.* 2013, Elshobary *et al.* 2016), 本実験において、地衣化子嚢菌類の生育に炭素源はリビトールのみで十分であることを示した意義は大きい。また第 3 章では、*R. conduplicans* KY1401 について、ロングリードの *de novo* ゲノムシーケンスを実施し、これまでの地衣化子嚢菌ゲノムで最少の 39 本のコンティグから成る 38.51 Mbp のゲノム情報取得した。これにより、*R. conduplicans* KY1401 のゲノムから複数のポリオール輸送体候補を選抜し、第 4 章においてポリオール輸送体クレードへの所属を示した。さらにほぼ全ての種が地衣化し、地衣化する最大の種を含む Lecanoromycetes では、特定の輸送体遺伝子が増加している傾向が得られた。これは Wang *et al.* (2014) で述べられた、地衣化子嚢菌類は特定の炭素源に依存するために糖輸送体遺伝子を減少させていることに関連する。つまり、糖輸送体遺伝子を減少させる代わりにポリオール輸送体遺伝子を増加させることで、ポリオールの効率的な利用やリビトールなどの特定のポリオールへの適応を成し遂げているのではないかと考察する。今後これらのタンパク質機能について詳細を明らかにすることで、地衣化子嚢菌類におけるポリオール輸送体の進化や地衣化現象との関連性がより明らかになると考えられる。

本研究では、地衣化子嚢菌類がポリオールの輸送や代謝に関して優位性または独自性を

有しているのではないかという仮説を立て、子囊菌類全体におけるポリオール輸送や代謝を明らかにすることで、仮説の検証に取り組んだ。その結果、子囊菌類では幅広い分類群においてポリオール輸送体が高く保存されており、また地衣化子囊菌類を含まない *Pezizomycetes* や *Sordariomycetes* を含む 4 綱でリビトールおよびマンニトールの資化性も確認された。すなわち、ポリオール輸送や代謝に関する基本的な機構は子囊菌類で広く保存されている可能性が高いことが分かった。しかしながら、*Lecanoromycetes* でポリオール輸送体遺伝子が増加している傾向が見られたことや、*Ramalina* 属でリビトールやマンニトールの高い資化性を示したことから、地衣化に伴い、特定のポリオールに対する輸送や代謝に対する機構を保存し、優位性または独自性につながる進化を遂げている可能性も示唆された。今後、*R. conduplicans* KY1401 のゲノム情報を利用し、ポリオール輸送体のパラログ間でのタンパク質機能の比較や mRNA シーケンスの発現量比較により、新規のポリオール輸送体およびポリオール代謝酵素遺伝子を得ることも可能であると考えられる。緑藻との共生に必須であるこれらの遺伝子を明らかにすることで、地衣類の共生機構や分子進化についても明らかにできると考えられる。mRNA シーケンスの発現量比較には、第 2 章で検討した合成培地を利用することが可能である。また、SNP 解析や DNA メチル化などのエピジェネティックな解析から、有用な二次代謝産物を効率的に合成する菌株を選抜するなど、応用も視野に入れた研究にもつなげていけると考えられる。

## 要約

地衣類は真菌と緑藻またはシアノバクテリアとの共生体であり、陸上生態系で普遍的に繁栄する最も成功した共生の一つである。地衣化するほぼ全ての真菌類は子囊菌類であり、その多くは緑藻類を共生藻とする。地衣化子囊菌類が緑藻類と共生する最大のメリットは、光合成産物であるポリオールを供給される点にあると考えられる。したがって、地衣化子囊菌類にとって、ポリオールの輸送や代謝機構は、緑藻との共生関係を維持し、生存・繁殖していくための重要基盤である。そこで本研究では、子囊菌類におけるポリオールの輸送や代謝に着目し、それらが地衣化によって優位性や独自性を有しているのではないかという仮説を立て、検証した。まず、子囊菌類におけるポリオール輸送体の保存性を分子系統学的に解析した結果、*Saccharomycotina* で知られていたポリオール輸送体が、他の子囊菌亜門の幅広い分類群においても保存されていた。また、ポリオールの代謝能力についても子囊菌門の4綱に属する非地衣化子囊菌類で確認した。したがって、ポリオールの輸送や代謝機構は子囊菌類に広く保存されていることが示唆された。しかしながら、地衣化子囊菌類に注目すると、*Lecanoromycetes* ではポリオール輸送体遺伝子が増加している傾向が見られた。*Lecanoromycetes* は緑藻との最も長い共生期間を経て、最も多様化している分類群である。したがって、これらの遺伝子重複が緑藻との共生関係を強化、または特定のポリオールへの適応をしているのではないかと考えられる。またポリオールの代謝能力についても、地衣化子囊菌類である *Ramalina* 属ではリビトールおよびマンニトールの高い資化性が示された。一方で、地衣類に内生する子囊菌類であっても、リビトールおよびマンニトールを資化できる菌は限られており、特にリビトールの資化性は多くの子囊菌類が失っていた。よって、代謝できるポリオールの種類や能力は種によって差が認められた。以上より、地衣化子囊菌類ではポリオール輸送体遺伝子の重複やポリオール代謝機構の保存による優位性または独自性を有している可能性が示唆された。

## 引用文献

- Abdel-Hameed M, Bertrand RL, Piercey-Normore MD, Sorensen JL, 2016. Putative identification of the usnic acid biosynthetic gene cluster by de novo whole-genome sequencing of a lichen-forming fungus. *Fungal Biology* **120**: 306–316. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.10.009
- Ahmadjian V, 1967. *The lichen symbiosis*. Waltham, MA, USA: Blaisdell Publishing Co. pp 152.
- Allen JL, McKenzie SK, Sleith RS, Alter SE, 2018. First genome-wide analysis of the endangered, endemic lichen *Cetradonia linearis* reveals isolation by distance and strong population structure. *American Journal of Botany* **105**: 1556–1567. DOI: 10.1002/ajb2.1150
- Alves-Araújo C, Hernandez-Lopez MJ, Prieto JA, Randez-Gil F, Sousa MJ, 2005. Isolation and characterization of the *LGTI* gene encoding a low-affinity glucose transporter from *Torulasporea delbrueckii*. *Yeast* **22**: 165–175. DOI: 10.1002/yea.1192
- Arnold AE, Miadlikowska J, Higgins KL, Sarvate SD, Gugger P, Way A, Hofstetter V, Kauff F, Lutzoni F, 2009. A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: Are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Systematic Biology* **58**: 283–297. DOI: 10.1093/sysbio/syp001.
- Beck A, Friedel T, Rambold G, 1998. Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* **139**: 709–720. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00231.x>
- Bednar TW, Smith DC, 1966. Studies in the physiology of lichens VI. Preliminary studies of photosynthesis and carbohydrate metabolism of the lichen *Xanthoria aureola*. *New phytologist* **65**: 211–220. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1966.tb06353.x>
- Billard P, Ménart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, Wésolowski-Louvel M, 1996. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: Role of the *HGTI* gene in glucose transport. *Journal of Bacteriology* **178**: 5860–5866.
- Bischoff HW, Bold HC, 1963. Some soil algae from enhanced rock and related algal species. Phycological Studies IV. *Univ. of Texas Publication* No. 6318, Texas, 95 pp

- Booth C, 1971. Fungal culture media. In: Booth C (edit), *Methods in Microbiology*, Volume 4, Chapter II, Academic Press, London, pp 49–94
- Carbone M, Loizides M, Alvarado P, 2015. Preliminary phylogenetic and morphological studies in the *Plectania melastoma* lineage (Ascomycota, Pezizales). *Ascomycete.org* **7**: 23–29.
- Castresana J, 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540–552. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Ceccaroli P, Saltarelli R, Polidori E, Barbieri E, Guescini M, Ciacci C, Stocchi V, 2015. Sugar transporters in the black truffle *Tuber melanosporum*: from gene prediction to functional characterization. *Fungal Genetics and Biology* **81**: 52–61. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.05.006
- Chapman BE, Roser DJ, Seppelt RD, 1994. <sup>13</sup>C NMR analysis of antarctic cryptogam extracts. *Antarctic Science* **6**: 295–305. <https://doi.org/10.1017/S0954102094000465>
- Colabardini AC, Ries LNA, Brown NA, Dos Reis TF, Savoldi M, Goldman MHS, Menino JF, Rodrigues F, Goldman GH, 2014. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology for biofuels* **7**: 46. DOI: 10.1186/1754-6834-7-46
- Cordeiro LM, Iacomini M, Stocker-Wörgötter E, 2004. Culture studies and secondary compounds of six *Ramalina* species. *Mycological Research* **108**: 489–497.
- Coronado-Ruiz C, Avendaño R, Escudero-Leyva E, Conejo-Barboza G, Chaverri P, Chavarría M, 2018. Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th-century art collection. *Scientific Reports* **8**: 7492. DOI: 10.1038/s41598-018-24934-7.
- Cowan DA, Green TGA, Wilson AT, 1979. Lichen metabolism. 1. The use of tritium labelled water in studies of anhydrobiotic metabolism in *Ramalina celastri* and *Peltigera polydactyla*. *New Phytologist* **82**: 489–503.
- Culberson CF, 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography A* **72**: 113–125. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(72\)80013-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(72)80013-X)

- Culberson CF, Johnson A, 1976. A standardized two dimensional thin-layer chromatographic method for lichen products. *Journal of Chromatography A* **128**: 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)99256-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)99256-2)
- Culberson CF, Johnson A, 1982. Substitution of methyl tert.-butyl ether for diethyl ether in the standardized thin-layer chromatographic method for lichen products. *Journal of Chromatography A* **238**: 483–487. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81336-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81336-9)
- Culberson CF, Kristinsson HD, 1970. A standardized method for the identification of lichen products. *Journal of Chromatography A* **46**: 85–93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)83967-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)83967-9)
- Dal Grande F, Sharma R, Meiser A, Rolshausen G, Büdel B, Mishra B, Thines M, Otte J, Pfenninger M, Schmitt I, 2017. Adaptive differentiation coincides with local bioclimatic conditions along an elevational cline in populations of a lichen-forming fungus. *BMC Evolutionary Biology* **17**: 93. DOI: 10.1186/s12862-017-0929-8.
- Dal Grande F, Meiser A, Greshake Tzovaras B, Otte J, Ebersberger I, Schmitt I, 2018. The draft genome of the lichen-forming fungus *Lasallia hispanica* (Frey) Sancho & A. Crespo. *The Lichenologist* **50**: 329–340.
- da Silva MDLC, Iacomini M, Jablonski E, Gorin PA, 1993. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage. *Phytochemistry* **33**: 547–452.
- Davis EC, Franklin JB, Shaw AJ, Vilgalys R, 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany* **90**: 1661–1667. DOI: 10.3732/ajb.90.11.1661.
- Deason TR, Bold HC, 1960. Phycological studies I. Exploratory studies of Texas soil algae. *Univ. of Texas Publication* Nr. 60022
- Delgado-Jarana J, Moreno-Mateos MA, Benítez T, 2003. Glucose Uptake in *Trichoderma harzianum*: Role of gtt1. *Eukaryotic Cell* **2**: 708–717. DOI: 10.1128/EC.2.4.708–717.2003
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O, 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465–469. DOI: 10.1093/nar/gkn180



- Diderich JA, Schuurmans JM, Van Gaalen MC, Kruckeberg AL, van Dam K, 2001. Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1515–1524. DOI: 10.1002/yea.779
- Diederich P, Puntillo D, 1995. New or interesting lichenicolous fungi. 7. *Nectria brutia* sp. nov. (Ascomycotina, Hypocreales). *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois* **96**: 95–98.
- Diezemann A, Boles E, 2003. Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics* **43**: 281–288. DOI 10.1007/s00294-003-0392-5
- Doehlemann G, Molitor F, Hahn M, 2005. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 601–610. DOI: 10.1016/j.fgb.2005.03.001
- Doveri F, 2011. Addition to “Fungi Fimicoli Italici”: An update on the occurrence of coprophilous Basidiomycetes and Ascomycetes in Italy with new records and descriptions. *Mycosphere* **2**: 331–427.
- Drew EA, Smith DC, 1967. Studies in the physiology of lichens. VIII. Movement of glucose from alga to fungus during photosynthesis in the thallus of *Peltigera polydactyla*. *New Phytologist* **66**: 389–400.
- Eisenreich W, Knispel N, Beck A, 2011. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochemistry Reviews* **10**: 445–456. DOI 10.1007/s11101-011-9215-3
- Elshobary ME, Osman ME, Abo-Shady AM, Komatsu E, Perreault H, Sorensen J, Piercey-Normore MD, 2016. Algal carbohydrates affect polyketide synthesis of the lichen-forming fungus *Cladonia rangiferina*. *Mycologia* **108**: 646–656. DOI: 10.3852/15-263.
- Esimone CO, Adikwu MU, 1999. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. *Fitoterapia* **70**: 428–431. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00054-4)

- Fazio AT, Adler MT, Maier MS. 2014. Usnic acid and triacylglycerides production by the cultured lichen mycobiont of *Ramalina celastri*. *Natural Product Communications* **9**: 213–214.
- Fernández-Mendoza F, Fleischhacker A, Kopun T, Grube M, Muggia L, 2017. ITS1 metabarcoding highlights low specificity of lichen mycobiomes at a local scale. *Molecular Ecology* **26**: 4811–4830. DOI: 10.1111/mec.14244
- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C, Brandt A, 2005. A Member of the sugar transporter family, St11p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 2068–2076. DOI: 10.1091/mbc.E04-10-0884
- Forment JV, Flipphi M, Ventura L, González R, Ramón D, Maccabe AP, 2014. High-affinity glucose transport in *Aspergillus nidulans* is mediated by the products of two related but differentially expressed genes. *PLoS ONE* **9**: e94662. DOI: 10.1371/journal.pone.0094662
- Fox CH, 1966. Experimental studies on the physiology of the phycobiont and mycobiont *Ramalina ecklonii*. *Physiologia Plantarum* **19**: 830–839. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1966.tb07071.x
- Friedl T, Büdel B, 2008. Photobionts. In: Nash III TH (ed), *Lichen biology*, 2nd edn. Cambridge University Press, New York, pp. 9–26.
- Gaio-Oliveira G, Dahlman L, Palmqvist K, Martins-Loução MA, Máguas C, 2005. Nitrogen uptake in relation to excess supply and its effects on the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach and *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Planta* **220**: 794–803. DOI: 10.1007/s00425-004-1396-1
- Galun M, Shomer-Ilan A, 1988. Secondary metabolic products. In: Galun M (ed), *CRC Handbook of Lichenology* Vol. III, Boca Raton: CRC Press. pp. 3–8.
- Geydan TD, Debets AJ, Verkley GJ, Van Diepeningen AD, 2012. Correlated evolution of senescence and ephemeral substrate use in the Sordariomycetes. *Molecular Ecology* **21**: 2816–2828. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05569.x
- Godinho RM, Wolterbeek HT, Verburg T, Freitas MC, 2008. Bioaccumulation behaviour of transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata* in relation to total deposition at a polluted

- location in Portugal. *Environmental Pollution* **151**: 318–325. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.034
- Gonçalves P, Rodrigues de Sousa H, Spencer-Martins I, 2000. *FSYI*, a novel gene encoding a specific fructose/H<sup>+</sup> symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Bacteriology* **182**: 5628–5630.
- Gonzalez-Menendez V, Martin J, Siles JA, Gonzalez-Tejero MR, Reyes F, Platas G, Tormo JR, Genilloud O, 2017. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycological Progress* **16**: 713–728. DOI: 10.1007/s11557-017-1305-1
- Grigoriev IV, Cullen D, Goodwin SB, Hibbett D, Jeffries TW, Kubicek CP, Kuske C, Magnuson JK, Martin F, Spatafora JW, Tsang A, Baker SE, 2011. Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* **2**: 192–209.
- Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, Smirnova T, Nordberg H, Dubchak I, Shabalov I, 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* **42**: D699–704.
- Gueidan C, Roux C, Lutzoni F, 2007. Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in Verrucariaceae (Verrucariales, Ascomycota). *Mycological Research* **111**: 1145–1168. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.08.010
- Gustavs L, Görs M, Karsten U, 2011. Polyol patterns in biofilm-forming aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* **47**: 533–537.
- Hájek J, Váczi P, Barták M, 2009a. Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens *Lasallia pustulata* and *Umbilicaria hirsute* affected by manipulated levels of ribitol. *Photosynthetica* **47**: 199–205.
- Hájek J, Váczi P, Barták M, Smejkal L, Lipavská H, 2009b. Cryoprotective role of ribitol in *Xanthoparmelia somloensis*. *Biologia Plantarum* **53**: 677–684.
- Hale ME, 1973. Growth. In: Ahmadjian V, Hale ME (eds), *The lichens*. Academic Press, New York, pp 473–492.

- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hansen K, Laessle T, Pfister DH, 2002. Phylogenetic diversity in the core group of *Peziza* inferred from ITS sequences and morphology. *Mycological Research* **106**: 879–902. DOI: 10.1017/S0953756202006287
- Hanus LO, Temina M, Dembitsky V. 2008. Biodiversity of the chemical constituents in the epiphytic lichenized ascomycete *Ramalina lacera* grown on different substrates *Crataegus sinensis*, *Pinus halepensis*, and *Quercus calliprinos*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **152**: 203–208.
- Hawksworth DL, Sherwood MA, 1981. A reassessment of three widespread resinicolous discipmycetes. *Canadian Journal of Botany* **59**: 357–372.
- Heiland S, Radovanovic N, Höfer M, Winderickx J, Lichtenberg H, 2000. Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology* **182**: 2153–2162.
- Henikoff S, Henikoff JG, 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10915–10919.
- Heuel H, Turgut S, Schmid K, Lengeler JW, 1997. Substrate recognition domains as revealed by active hybrids between the D-arabinitol and ribitol transporters from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **179**: 6014–6019.
- Honegger R, 2008. Morphogenesis. In: Nash III TH (ed), *Lichen biology*, 2nd edn. Cambridge University Press, New York, pp. 69–93.
- Honegger R, 2012. IV. Main building blocks and functional anatomy of lichen thalli. In 15 The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes and their endo- and epibionts. In: B. Hock (Ed.), *The Mycota IX Fungal Associations*, 2nd Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 305–315.
- Honegger R, Axe L, Edwards D, 2013. Bacterial epibionts and endolichenic actinobacteria and fungi in the Lower Devonian lichen *Chlorolichenomycites salopensis*. *Fungal Biology* **117**: 512–518. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.05.003.

- Honegger R, Kutasi V, Ruffner HP, 1993. Polyol patterns in eleven species of aposymbiotically cultured lichen mycobionts. *Mycological research* **97**: 35–39.
- Ingólfssdóttir K, 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* **61**: 729–736.
- Iwamoto K, Shiraiwa Y, 2005. Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology* **7**: 407–415. DOI: 10.1007/s10126-005-0029-4.
- Izumitsu K, Hatoh K, Sumita T, Kitade Y, Morita A, Gafur A, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C, 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* **53**: 396–401. DOI: 10.1007/s10267-012-0182-3
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R, 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818–822. DOI: 10.1038/nature05110
- Jennings DH, 1985. Polyol Metabolism in Fungi, in: Rose AH, Tempest DW (eds.), *Advances in Microbial Physiology* **25**, pp. 149–193.
- Jones DT, 2007. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* **23**: 538–544. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl677
- Jordan P, Choe JY, Boles E, Oreb M, 2016. Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Scientific Reports* **6**: 23502. DOI: 10.1038/srep23502

- Kayingo G, Martins A, Andrie R, Neves L, Lucas C, Wong B, 2009. A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. *Microbiology* **155**: 1547–1557. DOI: 10.1099/mic.0.023457-0
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (eds), 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford, pp. 591.
- Knapp DG, Kovács GM, Zajta E, Groenewald JZ, Crous PW, 2015. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Persoonia* **35**: 87–100. DOI: 10.3767/003158515X687669
- Komiya T, Shibata S, 1971. Polyols produced by the cultured phyco- and mycobionts of some *Ramalina* species. *Phytochemistry* **10**: 695–699.
- Koukol O, Baldrian P, 2012. Intergeneric variability in enzyme production of microfungi from pine litter. *Soil Biology and Biochemistry* **49**: 1–3.
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, and Thomas H. Nash III TH, 2008. Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* **111**: 576–593. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-111.4.576>
- Kroken S, Taylor JW, 2000. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* **103**: 645–660. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2000\)103\[0645:PSRMAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2000)103[0645:PSRMAS]2.0.CO;2)
- Kruckeberg AL, Bisson LF, 1990. The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 5903–5913.
- Kumar SVP, Kekuda TRP, Vinayaka KS & Sudharshan SJ. 2009. Anthelmintic and antioxidant efficacy of two Macrolichens of Ramalinaceae. *Pharmacognosy Journal* **1**: 238–242.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Lagarde A, Jargeat P, Roy M, Girardot M, Imbert C, Millot M, Mambu L, 2018. Fungal communities associated with *Evernia prunastri*, *Ramalina fastigiata* and *Pleurosticta acetabulum*: Three

- epiphytic lichens potentially active against *Candida* biofilms. *Microbiological Research* **211**: 1–12. DOI: 10.1016/j.micres.2018.03.006.
- Le SQ, Gascuel O, 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1307–1320. DOI: 10.1093/molbev/msn067
- Leandro MJ, Gonçalves P, Spencer-Martins I, 2006. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. *Biochemical Journal* **395**: 543–549. DOI: 10.1042/BJ20051465
- Leandro MJ, Sychrová H, Prista C, Loureiro-Dias MC, 2013. ZrFsy1, a high-affinity fructose/H<sup>+</sup> symporter from fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *PLoS ONE* **8**: e68165. DOI: 10.1371/journal.pone.0068165
- Lewis DH, Smith DC, 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* **66**, 143–184.
- Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD, 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* **25**: 69–80.
- Li J, Xu J, Cai P, Wang B, Ma Y, Benz JP, Tian C, 2015. Functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 4062–4070. DOI:10.1128/AEM.00165-15.
- Lichtenberg-Fraté H, Näschen T, Heiland S, Höfer M, 1997. Properties and heterologous expression of the glucose transporter *GHT1* from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **13**: 215–224. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(19970315)13:3<215::AID-YEA80>3.0.CO;2-5
- Lilly VG, Barnett HL, 1951. *Physiology of the Fungi*. New York: McGraw-Hill.
- Lindberg B, Misiorny A, Wachtmeister CA, 1953. Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. *Acta Chemica Scandinavica* **7**: 591–595. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.07-0591

- Lines CEM, Ratcliffe RG, Rees TAV, Southon TE, 1989. A  $^{13}\text{C}$  NMR study of photosynthate transport and metabolism in the lichen *Xanthoria calcicola* Oxner, *New Phytologist* **111**: 447–456.
- Lingner U, Münch S, Deising HB, Sauer N, 2011. Hexose transporters of a hemibiotrophic plant pathogen: functional variations and regulatory differences at different stages of infection. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 20913–20922. DOI: 10.1074/jbc.M110.213678
- Loescher WH, Marlow GC, Kennedy RA, 1982. Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiology* **70**: 335–339.
- Londesborough J, Richard P, Valkonen M, Viljanen K, 2014. Effect of C-terminal protein tags on pentitol and L-arabinose transport by *Ambrosiozyma monospora* Lat1 and Lat2 transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2737–2745. DOI: 10.1128/AEM.04067-13
- Lücking R, Hodkinson BP, Leavitt SD, 2016. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota - Approaching one thousand genera. *The Bryologist* **119**: 361–416. DOI: 10.1639/0007-2745-119.4.361
- Lumbsch HT, Rikkinen Y, 2017. Evolution of lichens. In: Dighton J, White JF (eds), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, 4th edn. CRC Press, Florida, pp. 53–62.
- Lumbsch HT, 1998. Taxonomic use of metabolic data in lichen-forming fungi. In: Frisvad JC, Bridge PD, Arora DK (eds), *Chemical fungal taxonomy*. Marcel Dekker, New York, pp 345–387
- Luo H, Wei X, Yamamoto Y, Liu Y, Wang L, Jung JS, Koh YJ, Hur JS, 2010. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. *Mycoscience* **51**: 391–395. DOI: 10.1007/s10267-010-0048-5
- Mandyam K, Loughin T, Jumpponen A, 2010. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia* **102**: 813–821.



- Meeßen J, Eppenstein S, Ott S, 2013. Recognition mechanisms during the precontact state of lichens: II. Influence of algal exudates and ribitol on the response of the mycobiont of *Fulgensia bracteata*. *Symbiosis* **59**: 131–143.
- Meiser A, Otte J, Schmitt I, Grande FD, 2017. Sequencing genomes from mixed DNA samples - evaluating the metagenome skimming approach in lichenized fungi. *Scientific Reports* **7**: 14881. DOI: 10.1038/s41598-017-14576-6.
- Miadlikowska J, Kauff F, Högnabba F, Oliver JC, Molnár K, Fraker E, Gaya E, Hafellner J, Hofstetter V, Gueidan C, Otálora MA, Hodkinson B, Kukwa M, Lücking R, Björk C, Sipman HJ, Burgaz AR, Thell A, Passo A, Myllys L, Goward T, Fernández-Brime S, Hestmark G, Lendemer J, Lumbsch HT, Schmull M, Schoch CL, Sérusiaux E, Maddison DR, Arnold AE, Lutzoni F, Stenroos S, 2014. A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **79**: 132–168. DOI: 10.1016/j.ympev.2014.04.003
- Milkowski C, Krampe S, Weirich J, Hasse V, Boles E, Breunig KD, 2001. Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake. *Journal of Bacteriology* **183**: 5223–5229. DOI: 10.1128/JB.183.18.5223–5229.2001
- Moreira AS, Braz-Filho R, Mussi-Dias V, Vieira IJ, 2015. Chemistry and biological activity of *Ramalina* lichenized fungi. *Molecules* **20**: 8952–8987. DOI: 10.3390/molecules20058952
- Muggia L, Grube M, 2018. Fungal diversity in lichens: from extremotolerance to interactions with algae. *Life* **8**: 15. DOI: 10.3390/life8020015.
- Nash TH III (ed), 2008. *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Negm FB, Marlow GC, 1985. Partial purification and characterization of d-ribose-5-phosphate reductase from *Adonis vernalis* L. leaves. *Plant Physiology* **78**: 758–761.
- Nei M, Kumar S, 2000. Phylogenetic inference: maximum parsimony methods, in: *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Niederberger C, Gräub R, Schweingruber AM, Fankhauser H, Rusu M, Poitelea M, Edenharter L, Schweingruber ME, 1998. Exogenous inositol and genes responsible for inositol transport are

- required for mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* **33**: 255–261.
- Nikawa J, Tsukagoshi Y, Yamashita S, 1991. Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **266**: 11184–11191.
- Nishizawa K, Shimoda E, Kasahara M, 1995. Substrate recognition domain of the Gal2 galactose transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by chimeric galactose-glucose transporters. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 2423–2426. DOI: 10.1074/jbc.270.6.2423
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R, 2001. Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The Plant Cell* **13**: 695–705.
- Nugent T, Jones DT, 2009. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics* **10**: 159. DOI: 10.1186/1471-2105-10-159
- Oh SO, Jeon HS, Lim KM, Young-Jin Koh YJ, Hur JS, 2006. Antifungal activity of lichen-forming fungi isolated from Korean and Chinese lichen species against plant pathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* **22**: 381–385.
- Olafsdottir ES, Ingólfssdottir K, 2001. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Medica* **67**: 199–208.
- Olennikov DN and Partilkhayev VV, 2013. Flavonoids and phenylpropanoids from several species of *Bupleurum* growing in Buryatia. *Chemistry of Natural Compounds* **48**: 1078–1082. DOI: 10.1007/s10600-013-0471-x.
- Osono T, 2007. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* **22**: 955–974. DOI 10.1007/s11284-007-0390-z
- Osono T, Tateno O, Masuya H, 2013. Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience* **54**: 54–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.003>

- Palma M, Seret ML, Baret PV, 2009. Combined phylogenetic and neighbourhood analysis of the hexose transporters and glucose sensors in yeasts. *FEMS Yeast Research* **9**: 526–534. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00511.x
- Palmqvist K, Dahlman L, Jonsson A, Nash TH III, 2008. The carbon economy of lichens. In: Nash TH III (ed), *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge. 182–215
- Parida AK, Das AB, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324–349.
- Park SY, Choi J, Kim JA, Jeong MH, Kim S, Lee YH, Hur JS, 2013a. Draft genome sequence of *Cladonia macilenta* KoLRI003786, a lichen-forming fungus producing biruloquinone. *Genome Announcements* **1**. pii: e00695-13. DOI: 10.1128/genomeA.00695-13.
- Park SY, Choi J, Kim JA, Yu NH, Kim S, Kondratyuk SY, Lee YH, Hur JS, 2013b. Draft genome sequence of lichen-forming fungus *Caloplaca flavorubescens* strain KoLRI002931. *Genome Announcements* **1**. pii: e00678-13. DOI: 10.1128/genomeA.00678-13.
- Park SY, Choi J, Lee GW, Kim JA, Oh SO, Jeong MH, Yu NH, Kim S, Lee YH, Hur JS, 2014a. Draft genome sequence of lichen-forming fungus *Cladonia metacorallifera* strain KoLRI002260. *Genome Announcements* **2**. pii: e01065-13. DOI: 10.1128/genomeA.01065-13.
- Park SY, Choi J, Lee GW, Jeong MH, Kim JA, Oh SO, Lee YH, Hur JS, 2014b. Draft genome sequence of *Umbilicaria muehlenbergii* KoLRILF000956, a lichen-forming fungus amenable to genetic manipulation. *Genome Announcements* **2**. pii: e00357-14. DOI: 10.1128/genomeA.00357-14.
- Patel TK, Williamson JD, 2016. Mannitol in plants, fungi, and plant-fungal interactions. *Trends Plant Science* **21**: 486–497. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.01.006.
- Pereira I, Madeira A, Prista C, Loureiro-Dias MC, Leandro MJ, 2014. Characterization of new polyol/H<sup>+</sup> symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS ONE* **9**: e88180. DOI: 10.1371/journal.pone.0088180
- Pfyffer GE, Rast DM, 1980. The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols. *Experimental Mycology* **4**: 160–170.

- Polidori E, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guescini M, Menotta M, Agostini D, Palma F, Stocchi V, 2007. Hexose uptake in the plant symbiotic ascomycete *Tuber borchii* Vittadini: biochemical features and expression pattern of the transporter TBHXT1. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 187–198. DOI: 10.1016/j.fgb.2006.08.001
- Prieto M, Baloch E, Tehler A, Wedin M, 2013. Mazaedium evolution in the Ascomycota (Fungi) and the classification of mazaediate groups of formerly unclear relationship. *Cladistics* **29**: 296–308. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2012.00429.x
- Prieto M, Schultz M, Olariaga I, Wedin M, 2018. Lichinodium is a new lichenized lineage in the Leotiomycetes. *Fungal Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0417-5>
- Rai AN, 2002. Cyanolichens: Nitrogen metabolism. In: Rai AN, Bergman B, Rasmussen U, (Eds.), *Cyanobacteria in Symbiosis*. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 97–115.
- Ranković B, Kosanić M, 2015. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In: Ranković B (ed), *Lichen Secondary Metabolites*. Springer, Switzerland, pp 1–26. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4>
- Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M, 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry* **245**: 324–333.
- Richard P, Londesborough J, Putkonen M, Kalkkinen N, Penttilä M, 2001. Cloning and expression of a fungal L-arabinitol 4-dehydrogenase gene. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 40631–40637. DOI: 10.1074/jbc.M104022200
- Richardson DHS, Hill DJ, Smith DC, 1968. Lichen physiology XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. *New Phytologist* **67**: 469–486.
- Richardson DHS, Smith DC, 1968a. Lichen physiology IX. Carbohydrate movement from the *Trebouxia* symbiont of *Xanthoria aureola* to the fungus. *New Phytologist* **67**: 61–68
- Richardson DHS, Smith DC, 1968b. Lichen physiology X. The isolated algal and fungal symbionts of *Xanthoria aureola*. *New Phytologist* **67**: 69–77

- Rikkinen J, Beimforde C, Seyfullah LJ, Perrichot V, Schmidt K, Schmidt AR, 2016. *Resinogalea humboldtensis* gen. et sp. nov., a New Resiniculous fungus from New Caledonia, Placed in Bruceomycetaceae fam. nova (Ascomycota). *Annales Botanici Fennici*, **53**: 205–215.
- Reed RH, Chudek JA, Foster R, Gadd GM, 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2119–2123.
- Rogers, JD, Miller AN, Vasilyeva LN, 2008. Pyrenomycetes of the Great Smoky Mountains National Park. VI. *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia* and *Xylaria* (Xylariaceae). *Fungal Diversity* **29**: 109–118.
- Roser DJ, Melick DR, Ling HU, Seppelt RD, 1992. Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica. *Antarctic Science* **4**: 413–420.  
<https://doi.org/10.1017/S0954102092000610>
- Sakata A, Matuzaki T, Yoshikawa H, Harada H. Lichens of Sugadaira Montane Research Center, University of Tsukuba, Ueda-shi, Nagano-ken, central Japan, as a record of collection during the 12th Field Meetings of the Japanese Society for Lichenology (Nov. 2013). *Lichenology* (submitted)
- Sasaki GL, Cruz LM, Gorin PA, Lacomini M. 2001. Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. *Lipids* **36**: 167–174.
- Schilling S, Oesterhelt C, 2007. Structurally reduced monosaccharide transporters in an evolutionarily conserved red alga. *Biochemical Journal* **406**: 325–331.  
DOI:10.1042/BJ20070448
- Schoch CL, Sung GH, Lopez-Giraldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie RM, Trippe K, Ciufetti LM, Wynns A, Fraker E, Hodkinson BP, Bonito G, Groenewald JZ, Arzanlou M, de Hoog GS, Crous PW, Hewitt D, Pfister DH, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Aptroot A, Suh SO, Blackwell M, Hillis DM, Griffith GW, Castlebury LA, Rossman AY, Lumbsch HT, Lücking R, Budel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser DM, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Mostert L, O'Donnell K, Sipman H, Rogers JD, Shoemaker RA, Sugiyama J, Summerbell

- RC, Untereiner W, Johnston PR, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer PS, Crittenden PD, Cole MS, Hansen K, Trappe JM, Yahr R, Lutzoni F, Spatafora JW, 2009a. The Ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* **58**: 224–239, DOI: 10.1093/sysbio/syp020
- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EW, Burgess TI, de Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EB, Kohlmeyer J, Kruys A, Li YM, Lücking R, Lumbsch HT, Marvanová L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJ, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Plata ER, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann-Kohlmeyer B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JH, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW, 2009b. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* **64**: 1–15. DOI: 10.3114/sim.2009.64.01
- Silvestro D, Michalak I, 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* **12**, 335e337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>.
- Sisodia R, Geol M, Verma S, Rani A, Dureja P. 2013. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Natural Product Research* **27**: 2235–2239. DOI: 10.1080/14786419.2013.811410
- Smith DC, 1961. The physiology of *Peltigera polydactyla* (Neck.) Hoffm. *The Lichenologist* **1**: 209–226
- Smith DC, 1963. Studies in the physiology of lichens IV. Carbohydrates in *Peltigera polydactyla* and the utilization of absorbed glucose. *New Phytologist* **62**: 205–216. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1963.tb06327.x>
- Smith DC, 1968. The movement of carbohydrate from alga to fungus in lichens. *Bulletin de la Société Botanique de France* **115**: 129–133. DOI: 10.1080/00378941.1968.10838622
- Søchting U, 2004. *Flavoparmelia caperata* – a probable indicator of increased temperatures in Denmark. *Graphis Scripta* **15**: 53–56.

- Spatafora JW, Sung GH, Johnson D, Hesse C, O'Rourke B, Serdani M, Spotts R, Lutzoni F, Hofstetter V, Miadlikowska J, Reeb V, Gueidan C, Fraker E, Lumbsch T, Lücking R, Schmitt I, Hosaka K, Aptroot A, Roux C, Miller AN, Geiser DM, Hafellner J, Hestmark G, Arnold AE, Büdel B, Rauhut A, Hewitt D, Untereiner WA, Cole MS, Scheidegger C, Schultz M, Sipman H, Schoch CL, 2006. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* **98**: 1018–1028. DOI: 10.3852/mycologia.98.6.1018
- Spribile T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP, 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* **353**: 488–492. DOI: 10.1126/science.aaf8287.
- Stoop JMH, Williamson JD, Pharr DM, 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**: 139–144. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80048-3)
- Suryanarayanan TS, Govindarajulu MB, Rajamani T, Tripathi M, Joshi Y, 2017. Endolichenic fungi in lichens of Champawat district, Uttarakhand, northern India. *Mycological Progress* **16**: 205–211. DOI 10.1007/s11557-016-1268-7
- Takahagi T, Yamamoto Y, Kinoshita Y, Takeshita S, Yamada T, 2002. Inhibitory effects of sodium chloride on induction of tissue cultures of lichens of Ramalina species. *Plant Biotechnology* **19**: 53–55. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.53>
- Tanaka K, Hirayama K, Yonezawa H, Sato G, Toriyabe A, Kudo H, Hashimoto A, Matsumura M, Harada Y, Kurihara Y, Shirouzu T, Hosoya T, 2015. Revision of the Massarineae (Pleosporales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology* **82**: 75–136. DOI: 10.1016/j.simyco.2015.10.002.
- 谷澤靖洋, 神沼英里, 中村保一, 遠野雅徳, 大崎研, 清水謙多郎, 門田幸二, 2016. 次世代シーケンサーデータの解析手法 第 7 回 ロングリードアセンブリ. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria* **27**: 101–110

- Tedersoo L, Arnold AE, Hansen K, 2013. Novel aspects in the life cycle and biotrophic interactions in Pezizomycetes (Ascomycota, Fungi). *Molecular Ecology* **22**: 1488–1493.
- Timsina BA, Sorensen JL, Weihrauch D, Piercey-Normore MD. 2013. Effect of aposymbiotic conditions on colony growth and secondary metabolite production in the lichen-forming fungus *Ramalina dilacerata*. *Fungal Biology* **117**: 731–743. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.09.003
- Tretiach M, Pavanetto S, Pittao E, Sanità di Toppi L, Piccotto M, 2012. Water availability modifies tolerance to photo-oxidative pollutants in transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata*. *Oecologia* **168**: 589–599. DOI: 10.1007/s00442-011-2104-z
- Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, and Hediger MA, 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *American Journal of Physiology* **277**: 685–696.
- Tysiaczny MJ, Kershaw KA, 1979. Physiological - environmental interactions in lichens. VII. The environmental control of glucose movement from alga to fungus in *Peltigera canina* v. *praetextata* Hue. *New Phytologist* **83**: 137–146. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1979.tb00735.x>
- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Arnold AE, 2010. Community analysis reveals close affinities between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. *Microbial Ecology* **60**: 340–353. DOI: 10.1007/s00248-010-9698-2.
- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Arnold AE, 2012. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany* **99**: 898–914. DOI: 10.3732/ajb.1100459.
- U'Ren JM, Riddle JM, Monacell JT, Carbone I, Miadlikowska J, Arnold AE, 2014. Tissue storage and primer selection influence pyrosequencing-based inferences of diversity and community composition of endolichenic and endophytic fungi. *Molecular Ecology Resources* **14**: 1032–1048. DOI: 10.1111/1755-0998.12252.
- U'Ren JM, Miadlikowska J, Zimmerman NB, Lutzoni F, Stajich JE, Arnold AE, 2016. Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae



- (Sordariomycetes, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **98**: 210–232. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.02.010.
- Utturkar SM, Klingeman DM, Land ML, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier DA, Brown SD, 2014. Evaluation and validation of de novo and hybrid assembly techniques to derive high-quality genome sequences. *Bioinformatics* **30**: 2709–2716. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu391
- Vankuyk PA, Diderich JA, MacCabe AP, Hererro O, Ruijter GJ, Visser J, 2004. *Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H<sup>+</sup> symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochemical Journal* **379**: 375–383. DOI: 10.1042/bj20030624
- Varma A, Singh BB, Karnani N, Lichtenberg-Fraté H, Höfer M, Magee BB, Prasad R, 2000. Molecular cloning and functional characterisation of a glucose transporter, *CaHGT1*, of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* **182**: 15–21.
- Verho R, Penttilä M, Richard P, 2011. Cloning of two genes (LAT1, 2) encoding specific L-arabinose transporters of the L-arabinose fermenting yeast *Ambrosiozyma monospora*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **64**: 604–611. DOI: 10.1007/s12010-011-9161-y
- Verma N, Behera BC, Joshi A, 2012. Studies on nutritional requirement for the culture of lichen *Ramalina nervulosa* and *Ramalina pacifica* to enhance the production of antioxidant metabolites. *Folia Microbiol (Praha)* **57**: 107–114. DOI: 10.1007/s12223-012-0100-2.
- Vinayaka KS, Praveen Kumar SV, Prashith Kekuda TR, Krishnamurthy YL, Mallikarjun N, Swathi D, 2009. Proximate composition, antioxidant, anthelmintic and insecticidal activity of a macrolichen *Ramalina conduplicans* Vain. (Ramalinaceae). *European Journal of Applied Sciences* **1**: 40–46.
- Wang Y, Han KS, Wang XY, Koh YJ, Hur JS, 2009. Effect of ribitol and plant hormones on aposymbiotical growth of the lichen-forming fungi of *Ramalina farinacea* and *Ramalina fastigiata*. *Mycobiology* **37**: 28–30. DOI: 10.4489/MYCO.2009.37.1.028.
- Wang Y, Zheng Y, Wang X, Wei X, Wei J, 2016. Lichen-associated fungal community in *Hypogymnia hypotrypa* (Parmeliaceae, Ascomycota) affected by geographic distribution and altitude. *Frontiers in Microbiology* **5**: 1231. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01231.

- Wang YY, Liu B, Zhang XY, Zhou QM, Zhang T, Li H, Yu YF, Zhang XL, Hao XY, Wang M, Wang L, Wei JC, 2014. Genome characteristics reveal the impact of lichenization on lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* Hedwig (Verrucariales, Ascomycota). *BMC Genomics* **15**: 34. DOI: 10.1186/1471-2164-15-34
- Wegmann K, 1986. Osmoregulation in eukaryotic algae. *FEMS Microbiology Reviews* **39**: 37–43.
- Wei X, Jeon HS, Han KS, Koh YJ, Hur JS, 2008. Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *The Plant Pathology Journal* **24**: 202–206.
- Weierstall T, Hollenberg CP, Boles E, 1999. Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular Microbiology* **31**: 871–883.
- Wendt L, Sir EB, Kuhnert E, Heitkämper S, Lambert C, Hladki AI, Andrea I. Romero AI, Luangsa-ard JJ, Srikitikulchai P, Peršoh D, Stadler M, 2018. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognized from a multigene phylogeny of the Xylariales. *Mycological Progress* **17**: 115–154. DOI 10.1007/s11557-017-1311-3
- Wésolowski-Louvel M, Goffrini P, Ferrero I, Fukuhara H, 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Molecular Genetics and Genomics* **233**: 89–96.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols*. Academic Press, New York, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Williamson JD, Jennings DB, Guo WW, Pharr DM, 2002. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 467–473.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels

K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzým K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P, 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880. DOI: 10.1038/nature724

山本好和, 2002. 地衣体を用いた地衣類の培養 (地衣組織培養). *Lichenology* 1: 57–65.

Yamamoto Y, Mizuguchi R, Yamada Y, 1985. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**: 3347–3348.

Yamamoto Y, Mizuguchi R, Takayama S, Yamada Y, 1987. Effects of culture conditions on the growth of Usneaceae lichen tissue cultures. *Plant and Cell Physiology* **28**: 1421–1426. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077434>

Yamamoto Y, Watanabe A, 1974. Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* **20**: 83–86. <https://doi.org/10.2323/jgam.20.83>

Yang Z, 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 306–314.

吉村庸, 1974. 原色日本地衣植物図鑑. 保育社

Yoshino K, Kawakami H, Sakamoto K, Optimizing synthetic culture medium for growth of *Ramalina conduplicans* mycobiont. *Lichenology* (in press).

Yoshino K, Yamamoto K, Hara K, Sonoda M, Yamamoto Y, Sakamoto K, 2019. The conservation of polyol transporter proteins and their involvement in lichenized Ascomycota. *Fungal Biology* (in press).

Zahradníková M, Andersen HL, Tønsberg T, Beck A, 2017. Molecular evidence of *Apatococcus*, including *A. fuscideae* sp. nov., as photobiont in the genus *Fuscidea*. *Protist* **168**: 425–438. DOI: 10.1016/j.protis.2017.06.002

Zhang T, Wei XL, Zhang YQ, Liu HY, Yu LY, 2015. Diversity and distribution of lichen-associated fungi in the Ny-Ålesund Region (Svalbard, High Arctic) as revealed by 454 pyrosequencing. *Scientific Reports* **14**: 14850. DOI: 10.1038/srep14850.

## 謝辞

本研究を終始指導してくださった坂本一憲教授に心より感謝の意を表します。本論文の審査をしていただいた宍戸雅宏教授，天知誠吾教授，宇佐見俊行准教授に心より御礼申し上げます。園田雅俊講師からは様々な実験手法について学ばせていただき，培養器なども快く提供していただきました。深く感謝を申し上げます。土肥博史准教授には実験や解析についてご指導いただきました。心より感謝を申し上げます。

千葉県立中央博物館の原田浩博士には地衣類の採集や観察方法，生態について多くのご指導をいただきました。ここに謹んで感謝の意を表します。秋田県立大学の山本好和名誉教授には地衣類の培養方法や生理についてご指導いただきました。厚く御礼を申し上げます。栃木県立博物館の山本航平博士には菌類の生態について多くの知識をご教授いただき，また実験手法，論文構成ならび研究費獲得のための申請書についても大変有益な示唆を承りました。心より感謝申し上げます。秋田県立大学の原光二郎准教授には，実験に対する多くのご助言ならびに貴重な情報をいただきました。深く感謝申し上げます。秋田県立大学の川上寛子助教には実験手法ならびに地衣類の化学成分についてご教授いただきました。心より御礼申し上げます。国立研究開発法人産業技術総合研究所の柿澤茂行博士には研究費獲得のための申請書について大変貴重なご助言をいただきました。心より御礼申し上げます。日本地衣学会ならびに日本菌学会の皆さまには地衣類や菌類に関する多くの知識をご教授いただき，また研究に対する様々なご助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

いつも気にかけて激励してくださった犬伏和之教授，進化の面白さを教えてくださり，研究者としての見本を示してくださった華岡光正准教授，研究費獲得のための申請書に多くのコメントをくださった上原浩一教授ならびに百原新教授，実験に関するご助言をしていただいた中牟田潔教授には心より御礼申し上げます。この他にも多くの方に，実験装置の扱い方や研究に対するご助言をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、私のことを常に信頼してくださり、研究に専念できるよう環境を整えてくれた  
両親に心より感謝申し上げます。