

# 鰹節カビのゲノム解析

二神泰基

鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター 醸造微生物学部門  
〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

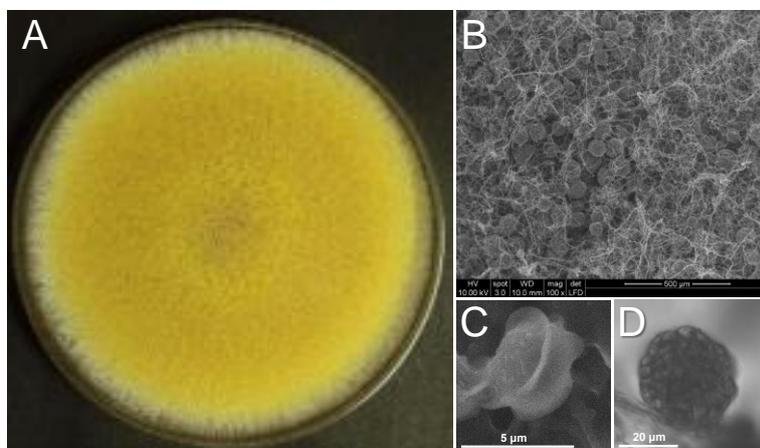
## 要旨

伝統的手法により鰹節を製造する現場では、カビ付室において自然発生するカビが使用されている。我々は、自然発生カビにより製造された鰹節の菌叢を解析し、主要な菌種が *Aspergillus chevalieri* であることを明らかにした。本研究では、鰹節カビ *A. chevalieri* の有用性質の産業利用を促進することを目的として、ゲノム解析を行った。

## 1. 緒言

鰹節には、生の鰹を煮た後に燻してできる荒節と、さらにカビ付けと天日干しの工程を経てできる枯節がある。カビ付けには、低水分環境で増殖可能な *Aspergillus* 属のカビが用いられており、枯節の品質に大きく影響する。鰹節カビが産生する酵素は余分なタンパク質や脂肪を分解し、枯節に独特の芳香と光沢を生む。

先行研究において、我々は鹿児島県枕崎市の鰹節の製造現場で用いられるカビの菌叢を解析し、カビ付室で自然発生する主要な鰹節カビが *Aspergillus chevalieri* であることを明らかにした (Fig. 1)<sup>1)</sup>。そこで本研究では、*A. chevalieri* のゲノム解析を行うことにした。これまでに鰹節カビのゲノム情報は公開されていないため、本研究により鰹節カビのゲノム情報を公開することで、鰹節カビを耐乾性、耐塩性酵素などの有用遺伝子資源として利用することが容易になると考えた。また、和食に欠かせない鰹節の文化を国際発信する際の科学的知見として利用できるようになると期待した。



**Fig. 1** Colony formation and microscopic observation of *Aspergillus chevalieri* strain M1. Spores of strain M1 were inoculated onto M40Y agar medium and incubated at 30°C for 7 days (A), and observed by scanning electron microscope (B, C) or optical microscope (D).

## 2. 実験方法

### 2.1 ゲノム DNA と RNA の抽出

*A. chevalieri* M1 株<sup>1)</sup>の胞子を M40Y 液体培地 (40% [wt/vol] スクロース, 2% [wt/vol] malt extract, 0.5% [wt/vol] yeast extract) に植菌し、30°Cで一晩振とう培養した。培養液をガーゼで濾し、菌体を回収した。菌体を乳鉢に入れて液体窒素により凍結し、乳棒でパウダー状になるまで破砕した。その後、DNAs-ici!-F (Rizo Inc., Tsukuba, Japan) を用いてゲノム DNA を抽出した。また、RNAiso plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) と SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI) を用いて RNA を抽出した。

### 2.2 シーケンス解析

ゲノム DNA の配列は Oxford Nanopore Technologies (ONT) の MinION と Illumina の NovaSeq 6000 で解析した。MinION 用のライブラリー調整は Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) で行った。また、MinION によるシーケンスには Flow cell R9.4.1 を用いた。一方、NovaSeq 6000 用のライブラリー調整は NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (E7645) で行い、ペアエンド法で解析した。なお PCR によるエラーを避けるため、いずれのライブラリー調整も PCR フリーのキットを選択した。

次に、RNA シーケンス解析のライブラリー調整は NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (E7420) で行い、NovaSeq 6000 により解析した。なお、NovaSeq 6000 によるシーケンス解析は株式会社ケミカル同仁の Gene Nex 受託解析サービスにより実施した。

### 2.3 ゲノムアセンブリ

MinION により取得したロングリード (ONT リード) は *de novo* アセンブルに使用した。一方、NovaSeq 6000 により取得したショートリード (Illumina リード) は、エラーの修正に使用した。ONT リードのアダプター配列を Porechop v0.2.4 により除去し、さらにキメラリードを Yacrd v0.6.1 により除去した。一方、Illumina リードは Fastp v.0.20.1 でフィルタリングした。なお、ONT リードと Illumina リードのカバー率はそれぞれ 178 と 179 であった。

ONT リードは Canu v.2.0<sup>2)</sup>、Flye v2.8-b1674<sup>3)</sup>、および Raven v1.5.0<sup>4)</sup>でアセンブルした。なお Flye と Raven は、Canu のコンティグを橋渡しするために使用した。また、ONT リードは medaka v1.0.3 と pilon v1.23 で、Illumina リードは pilon v1.23 で polish した。アセンブルの成否はコンティグの末端にテロメアが存在するかどうかで判断した。

### 2.4 遺伝子予測

染色体 DNA の配列は Funannotate v1.8.1<sup>5)</sup>により解析し、ミトコンドリア DNA の配列は MFannot v1.1<sup>6)</sup>により解析した。Funannotate では、RNA シーケンスのリードを遺伝子予測に使用した。RNA シーケンスのリードは Trinity v2.8.5 によりアセンブルし、

HISAT v2.2.0 により染色体 DNA の配列にマッピングした。また、遺伝子予測の結果を PASA v2.4.1 によりアップデートした。

予測された遺伝子について各データベース (dbCAN2 v9.0、MEROPS v12.0、MIBiG v1.4、Pfam v33.1、UniProt v2020\_05、antiSMASH v5.1.2、Barrnap v0.9、EggNOG v4.5、InterProScan v5.47-82.0、Phobius v1.01、SignalP v4.1、tRNAscan-SE v2.0.7) に登録されている配列情報との相同性に基づいてアノテーション情報を付与した。

## 2.5 ゲノムアセンブリと遺伝子予測の評価

ゲノムアセンブリと遺伝子予測の完全性は、BUSCO v5.1.2<sup>7)</sup>で評価した。その際、*ascomycota\_odb10* をデータセットとして使用した。

## 3. 結果と考察

鱈節カビ *A. chevalieri* M1 株のゲノム解析を ONT のロングリード解析と Illumina のショートリード解析を組み合わせた手法で実施した。その結果、8 つの染色体 DNA と 1 つのミトコンドリア DNA からなる 9 つのコンティグが形成された (Table 1)。したがって、ほぼ完全なゲノム情報を取得できた。なお、全長は 29,748,498 bp であった。また、10,356 の推定 Coding sequences と 196 の推定 tRNA が同定された。

**Table 1.** Chromosomes of *A. chevalieri* strain M1

Location	Accession no.	Size (Mb)	GC%	no. of CDS	no. of rRNA	no. of tRNA
Chr. 1	AP024416.1	5.59	49.2	1,944	-	28
Chr. 2	AP024417.1	4.31	49.2	1,471	-	36
Chr. 3	AP024418.1	4.1	49.3	1,423	-	21
Chr. 4	AP024419.1	3.79	49.4	1,366	-	18
Chr. 5	AP024420.1	3.72	49.4	1,312	-	24
Chr. 6	AP024421.1	2.96	49.2	1,043	-	11
Chr. 7	AP024422.1	2.8	49.3	943	27 (82) <sup>a</sup>	11
Chr. 8	AP024423.1	2.43	49.1	839	-	20
MT	AP024424.1	0.05	28.1	15	1	27

Abbreviations: Chr, chromosome; MT, mitochondria.

<sup>a</sup> The number of rRNA genes is not clear due to their highly repetitive structure. The number in parenthesis indicates the estimated copy number based on the median per-base coverage.

ゲノムアセンブリと遺伝子予測の完全性を評価するために、子囊菌類の core gene set がどの程度保存されているのかを BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) で解析した。その結果、complete and single-copy BUSCO は 97.9%、complete and duplicate-copy BUSCO は 0.4%、fragmented-copy BUSCO は 0.5%、missing BUSCO は 1.2% であった。missing BUSCO のほとんどは、実際にはゲノムにコードされることを

BLAST 解析で確認した。よって、missing BUSCO の存在は遺伝子予測の取りこぼしが主要な原因であった。

鰹節の製造過程において、鰹節カビはタンパク質や脂質の分解、香味の形成に重要な役割を担っている。*A. chevalieri* のゲノムにコードされる推定 ORF の機能を各データベースを用いて予測した結果、例として 307 の推定糖質加水分解酵素と 446 の推定タンパク質分解酵素が同定された。本研究で取得した *A. chevalieri* M1 株のゲノム情報は DDBJ/ENA/GenBank で公開しており、今後はゲノム情報に基づいた新規酵素の探索研究が進展することが期待される。

#### 4. 成果発表

本研究の成果は、以下で発表した。

Kadooka C, Mori K, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Tashiro K, Tamaki H, Futagami T. 2021. Chromosome-level genome sequence of *Aspergillus chevalieri* M1, isolated from katsuobushi. *Microbiol Resour Announc.* 10:e0038521.

#### 5. 謝辞

本研究に助成していただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また本研究を実施するにあたり、森一樹博士をはじめとする多くの先生方にご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。

#### 6. 引用文献

- 1) Kadooka C, Nakamura E, Kubo S, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Tamaki H, Futagami T. 2020. Analysis of the fungal population involved in Katsuobushi production. *J Gen Appl Microbiol* 66:239–243.
- 2) Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27:722–736. doi:10.1101/gr.215087.116.
- 3) Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol* 37:540–546. doi:10.1038/s41587-019-0072-8.
- 4) Vaser R, Sikic M. 2020. Raven: a *de novo* genome assembler for long reads. bioRxiv 2020.08.07.242461.
- 5) Palmer JM, Stajich JE. 2020. Funannotate v1.8.1: Eukaryotic genome annotation. Zenodo doi:10.5281/zenodo.4054262.
- 6) Beck N, Lang BF. 2010. MFannot. <http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl>.
- 7) Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. 2019. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods Mol Biol* 1962:227–245. doi:10.1007/978-1-4939-9173-0\_14.

# Genome analysis of the osmophilic filamentous fungi involved in Katsuobushi production

Taiki Futagami

Education and Research Centre for Fermentation Studies, Faculty of Agriculture,  
Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan.

In this study, we analyzed the chromosome-level genome sequence of the osmophilic filamentous fungus *Aspergillus chevalieri* M1, which was isolated from a dried bonito, katsuobushi. This fungus plays a significant role in the fermentation and ripening process. Thus, elucidating the sequence data for this fungus will aid in subsequent genomic research on the fungi involved in katsuobushi production.