

令和元年6月17日現在

機関番号：62611

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06211

研究課題名(和文)南極産菌類の極限環境下における生存戦略の解明と有用な二次代謝産物の探索

研究課題名(英文)Study on cold adaptation strategies and secondary metabolites of Antarctic yeast

研究代表者

辻 雅晴(TSUJI, Masaharu)

国立極地研究所・研究教育系・特任研究員

研究者番号：70756923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：昭和基地周辺に生息している菌類の優占種であるMrakia属菌について、全ゲノム解析、メタボローム解析を行うことで、通常の生物にとって生存が困難な氷点下でどのように生存しているのか解明を試みた。その結果、低温での成長能に優れた南極産のMrakia blollopisは氷点下での低温ストレスに対抗するため、多大なエネルギー的コストを支払いながら氷点下という低温環境に適応し、成長していることが示唆された。また、南極産菌類が持つ二次代謝産物について調査した結果、医薬品の原料となる物質を多数分泌していることが明らかとなった。以上のことから南極産菌類が微生物資源として有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昭和基地周辺の菌類のうち、約35%を占めるMrakia属菌が極限環境下で生き抜くために細胞内でどのような遺伝子や代謝の応答を行っているのかを明らかにすることで、大陸性南極でも豊かな生態系が存在するとされている昭和基地周辺において、どのように生態系が維持されているのか？を解明する足がかりとなったと考えている。また、南極大陸は微生物資源調査における最後のフロンティアとされていることから、この地域に生息している菌類が持つ有用な二次代謝産物を積極的に探索したことで、将来的に様々な企業に大きなインパクトを与えることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：The genus Mrakia is a dominant fungus around Syowa Station, East Antarctica. I chose this genus to study how this genus survives under the sub-zero temperature condition using by whole genome and metabolome analysis. Consequently, I found that Mrakia blollopis consumes large amounts of energy during growth to help it cope with cold stress as it grows in subzero temperatures.

I also checked the secondary metabolite having Antarctic fungi. It has become clear that Antarctic fungi are secreting many substances that are the raw materials of pharmaceuticals. From the above, it has become clear that Antarctic fungi are useful as bioprospecting source.

研究分野：菌学

キーワード：南極 菌類 全ゲノム解析 メタボローム 解析 二次代謝産物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南極のような極地に生息している菌類は氷点下でも成長できることから有機物の最終分解者として極地における物質循環に重要な役割を果たしている (Biodivers Conserv 5: pp 1395-1431, 1996)。このことから極地に生息している菌類が極限環境に対してどのように適応し、生存しているのかを知ることは、この地域における生態系を理解する上でも重要である。

これまで極地から分離された菌類の低温下における生存戦略に関する研究は分離した菌類の菌体脂肪酸含有比率の変化や不凍タンパク質、細胞外多糖のような凍結防止剤を分泌しているかどうかなど生理学的特徴について注目されてきた (New Phytol 151: 341-353, 2001)。

また、低温下での菌類の細胞内における生存戦略に関する研究はモデル生物でもある *Saccharomyces cerevisiae* がグリセロール合成系やトレハロース合成系、熱ショックタンパク質のような低温ストレス耐性に関係している遺伝子の発現量をどのように変化させているのかについて調べられているだけである (Cold adapted yeast, pp 243-257, 2013)。従って、南極などの極地に生息しており氷点下でも成長可能な菌類がどのような遺伝子や代謝の応答により、生物にとって致死である細胞内凍結を回避しながら成長しているのかは未だに不明のままであり、このことが極地においてどのように生態系が維持されているのかを理解する上で障害となっている。

さらに近年、極地産菌類が持つ有用な特徴を洗剤 (例えばノボザイム社の Novozyme 435) や食品の凍結防止剤に利用しようとする動きがあり、その中でも南極産菌類が持つ二次代謝産物は特に微生物資源として注目を集め始めている (The ISME Journal 7, 1434-1451, 2013; Fungal biolo biotechnolo 2.1, 2015)。しかし、我が国における南極産菌類が持つ有用な特徴を利用した知的財産は申請者が出願した (業績 15、業績 16、業績 18、業績 20) 以外では研究協力者である産業技術総合研究所の星野保博士らによる「南極産子嚢菌類の産生する不凍タンパク質」 (特許第 5397848 号) のみであり、南極産菌類が持つキレートキシンのような抗生物質やカロテノイド系色素など医薬品や健康食品の原料として期待されている有用な二次代謝産物の探索などによる新たな知的財産の取得や応用研究の必要性がある。

2. 研究の目的

本申請課題では、氷点下でも生存可能な南極産菌類について、全ゲノム解析、メタボローム解析を用いることにより、世界で初めて氷点下での生存戦略を明らかにする。また、南極産菌類が持つ有用な二次代謝産物の探索を積極的に行い、将来的に企業との共同研究に発展させ、産業利用に繋げて行くことを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) すでに採取されている昭和基地周辺の土壌や湖底堆積物などの環境試料について、各サンプルの pH、水分含量、栄養塩濃度、全炭素・窒素濃度の測定を行う。
- (2) 各地域から採取された異なる環境サンプルから *Mrakia* 属菌を計 50 株取得する。取得した *Mrakia* 属菌は The yeast (Fifth edition); a taxonomic study に記載されている方法に従い種名を決定する。
- (3) 種名を決めた *Mrakia* 属菌について全ゲノム配列の解析を行う。
- (4) 種名を決めた *Mrakia* 属菌を至適増殖温度である 10 で培養し続けた場合と 10 で培養したのち -3 に温度を下げて培養した場合、それぞれの温度での代謝産物蓄積量の変化をメタボローム解析の中でも特にキャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS) により明らかにする。
- (5) 取得した *Mrakia* 属菌が持つ有用な二次代謝産物候補を探索するため、液体クロマトグラフィー質量分析法およびガスクロマトグラフィー質量分析法により分析する。

4. 研究成果

(1) 土壌および湖底堆積物の成分分析

まずは昭和基地周辺の土壌や湖底堆積物の各サンプルについて水分含量、pH、全炭素、全窒素の測定を行なった。昭和基地周辺における各種の数値は以下のようになった。

	水分含有率	pH	全炭素	全窒素
土壌	2.53%	6.32	0.04%	0.002%
湖底堆積物	-*	8.19	11.16%	0.69%

*湖底堆積物は大量の水分を含んでいるので、湿重量は測定していない

土壌の各種成分分析の結果から、昭和基地周辺では土壌の pH、全窒素、全炭素の数値と湖底堆積物の各種の数値が異なること、特に全炭素では 10% を超えており、貧栄養な南極では貴重な炭素源となっていることが明らかになった。

(2) *Mrakia* 属菌の分離と同定

(1) で成分分析に使用した土壌および湖底堆積物から菌株の分離を試みた。その結果、約 500 株の菌株を取得することが出来た。これらの菌株について菌類の系統解析に広く用いられてい

ITS領域 (Internal transcribed spacer) と 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列を基に種の同定を行なった。ITS 領域および D1/D2 領域の塩基配列により、50 株の *Mrakia* 属菌を分離することができた。その内訳は *Mrakia blollopis* が 22 株、*M. gelida* が 18 株、*M. frigida* と *M. robertii* が 5 株ずつとなった。

(3) 全ゲノム解析

分離した *Mrakia* 属菌について、至適増殖温度の 10℃ と液体培地が凍らない下限温度である -3℃ でそれぞれ培養を行ってみた。その結果、同じ *Mrakia blollopis* でも -3℃ で 10℃ と同等の増殖能を持つ SK-4 株と -3℃ ではあまり増殖できない TKG1-2 株という 2 つの株が存在することが分かった。そこで、同じ種ではあるが氷点下での増殖能が大きく異なる SK-4 株と TKG1-2 株について次世代シーケンサー PacBio RS-II を利用し、全ゲノム解析を行うことにした。その結果、氷点下での成長に優れた SK-4 株のゲノムサイズは 30.5Mb であったのに対して、氷点下ではあまり成長できない TKG1-2 株のゲノムサイズは 68.3Mb となり、同種ではあるがゲノムサイズが 2 倍以上異なる結果となった。取り込んだ栄養分を分解してエネルギーを生成し、更に細胞を構成するための部品を供給する代謝経路である中心炭素代謝経路に参与している遺伝子について、SK-4 株と TKG1-2 株の全ゲノム配列から遺伝子を抽出し比較してみたところ、SK-4 株では計 29 個の遺伝子が関与していたが、ゲノムサイズの大きな TKG1-2 株では計 60 個の遺伝子が関与していることが明らかになった。このうち SK-4 株と TKG1-2 株では 12 個の遺伝子が共通していた (図 1)。

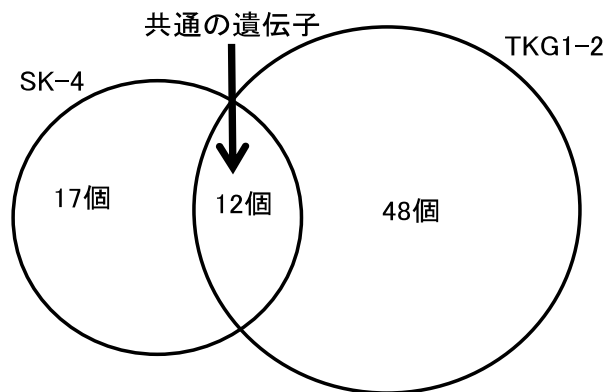


図 1. SK-4 株と TKG1-2 株のゲノム解析の結果

このことから SK-4 株と TKG1-2 株は同種だがゲノムサイズ、中心炭素代謝経路に参与している遺伝子共に大きく違うことが分かった。

(4) メタボローム解析による低温適応戦略の解明

Mrakia 属菌は好冷菌であるにもかかわらず、不凍タンパク質の遺伝子を持たず、凍結防止剤として働く細胞外多糖もあまり分泌しないが、-10℃ 以下でも細胞内凍結を起こさずに生存できるという驚異的な能力を持っている。そこで氷点下で成長が優れた SK-4 株と氷点下では、あまり成長できない TKG1-2 株で低温ストレス下では、どのように代謝応答を行なっているのかをメタボローム解析することとした。その結果、SK-4 株は、氷点下では低温ストレスにより代謝経路を変更していることが分かった (図 2)。また SK-4 株は細胞分裂や細胞壁合成などの代謝経路が活発になるほか、低温下での成長に参与し、生合成するのに大量の ATP を消費する物質として知られているトリプトファンなどの芳香族アミノ酸を多く蓄積していた。しかし、TKG1-2 株では、低温ストレスによるはっきりとした代謝反応の変更や、このような代謝産物の顕著な蓄積は認められなかった。以上のことから、低温での成長能に優れた南極産の *Mrakia blollopis* は氷点下での低温ストレスに対抗するため、多大なエネルギー的コストを支払いながら氷点下という低温環境に適応し、成長していることが示唆された。

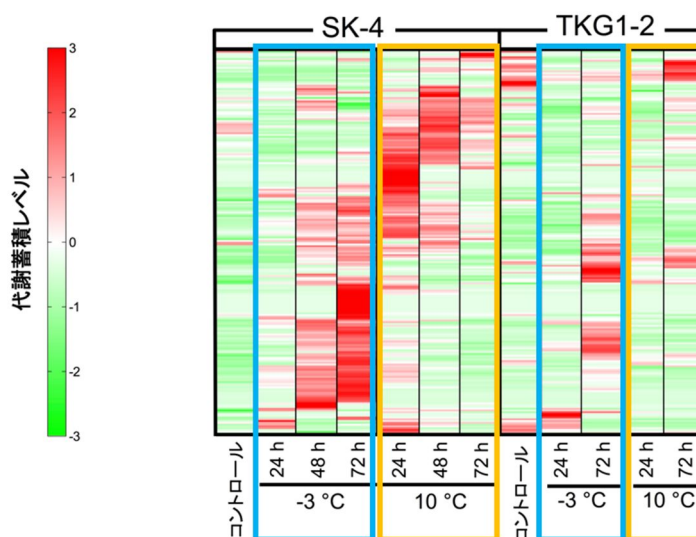


図 2. SK-4 株と TKG1-2 株の代謝解析の結果

(5) 有用な二次代謝産物の探索

南極域に生息している菌類は強い紫外線から遺伝子を守る為、カロテノイド系色素を持ってい

るだけでなく、キラートキシンのような抗真菌物質を持っていることが報告されている (Polar Biol 9: pp. 305-309, 1989, J Agric Food Chem 50: 2249-2255, 2002 等)。このことから、南極域は深海と並び、微生物資源調査の最後のフロンティアとされている。菌類の二次代謝産物は成長や生殖には直接、関与していない代謝産物であるが、新規の医薬品や化学原料の候補として考えられている。そこで、昭和基地周辺から分離した菌について、有用な二次代謝産物の探索を行なった。有用な二次代謝産物を表にまとめた。

化合物名	化学式	主な用途・作用
Pirbuterol	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃	気管支拡張薬
Peltatol A	C ₄₂ H ₅₈ O ₄	HIV 感染阻止作用
Pinacidil	C ₁₃ H ₁₉ N ₅	抗高血圧薬 (降圧剤)
Methaphenilene	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ S	抗ヒスタミン薬
Altretamine	C ₉ H ₁₈ N ₆	抗腫瘍薬
Zalcitabine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃	ヌクレオシド系抗ウイルス薬
Nitisinone	C ₁₄ H ₁₀ F ₃ NO ₅	高チロシン血症 I 型治療薬
Tegafur	C ₈ H ₉ FN ₂ O ₃	抗がん剤
Acebutolol	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	狭心症治療薬

エタノール吸収阻害剤のカメリアサポニン B、気管支拡張薬の Pirbuterol、抗悪性腫瘍薬のアルトレタミンなどと類似の有用と思われる二次代謝産物を分泌していた。これらのことから、南極産菌類は微生物資源として有用であることが明らかとなった。また、二次代謝産物の約 9 割が未知のものであったことから、これらの物質の性質を調べることで、新たな医薬品、化学原料として利用できる可能性がある。以上のことから南極産菌類が微生物資源として有用であることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Tsuji M, Tanabe Y, Vincent WF, Uchida M, *Vishniacozyma ellesmerensis* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from a retreating glacier in the Canadian High Arctic, Vol. 69, No.3, 2019, pp. 696-700

DOI: 10.1099/ijsem.0.003206

Tsuji M, Tanabe Y, Vincent WF, Uchida M, *Mrakia hoshinonis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from a retreating glacier on Ellesmere Island in the Canadian High Arctic, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 69, No.4, 2019, pp. 944-948

DOI: 10.1099/ijsem.0.003216

Tsuji M, Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion, Polar biology, 査読有り, Vol.41, No.2, pp. 249-258

DOI: 10.1007/s00300-017-2185-1

Tsuji M, A catalog of fungi recorded from the vicinity of Syowa Station, Mycoscience, 査読有り, Vol. 59, No.4, 2018, pp. 319-324

DOI: 10.1016/j.myc.2017.08.007

Tsuji M, Tanabe Y, Vincent W.F., Uchida M, *Mrakia arctica* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from an ice island in the Canadian High Arctic, Mycoscience, 査読有り, Vol. 59, No.1, 2018, pp. 54-58

DOI: 10.1016/j.myc.2017.08.006

Tsuji M, Tanabe Y, Vincent W.F., Uchida M, *Gelidatrema psychrophila* sp. nov., a novel yeast species isolated from an ice island in the Canadian High Arctic, Mycoscience, 査読有り, Vol. 59, No.1, 2018, pp. 67-70

DOI: 10.1016/j.myc.2017.08.010

星野 保・辻 雅晴・肖 南・工藤 栄、南極湖沼より得られた菌類の性質とその産業利用、極地、査読無し, Vol. 52, No.1, 2016, pp. 20-24.

星野 保・辻 雅晴・横田 祐司・工藤 栄・内海 洋・湯本 勲、南極産酵母の環境適応機構の

解明とその産業利用、生物工学会誌、査読無し、Vol. 94, No.4、2016、pp. 329-331.
Tsuji M, Tsujimoto M, S Imura, *Cystobasidium tubakii* and *Cystobasidium ongulense*,
new basidiomycetous yeast species isolated from East Ongul Island, East Antarctica,
Mycoscience, 査読有、Vol. 58, No.2、2017、pp.103-110
DOI: 10.1016/j.myc.2016.11.002
Tsuji M, Uetake J, Tanabe Y、Changes in fungal community of Austre Brøggerbreen
deglaciation area, Ny-Ålesund, Svalbard, High Arctic、Mycoscience, 査読有、Vol.57,
No. 6、2016、pp.448-451
DOI: 10.1016/j.myc.2016.07.006
Tsuji M、Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia*
blollopis、Royal Society Open Science、査読有、Vol.3、No.7、2016、pp.160106
DOI: 10.1098/rsos.160106
Singh P, Tsuji M, Roy U、Characterization of yeast and filamentous fungi from
Brøggerbreen glaciers, Svalbard、Polar record, 査読有、Vol. 52, No.04、2016、pp. 442-
449
DOI: 10.1017/S0032247416000085

〔学会発表〕(計 15 件)

Kaneko R, Kiatagawa R, Nishizawa K, Masumoto S, Mori A, Uetake J, Tsuji M, Uchida
M、Soil bacterial communities in Canadian subarctic tundra、第 9 回極域シンポジウム、
2018、12 (東京都、立川市)
辻 雅晴、中澤 文男、伊村 智、南北両極氷床コアに眠る菌類、第 61 回日本菌学会大会、
2018、5 (長野県、伊那市)
辻 雅晴、田邊 優貴子、WF Vincent、内田 雅己、カナダ高緯度北極 エルズミア島氷河
後退域における菌類の多様性、第 9 回極域シンポジウム、2018、12 (東京都、立川市)
辻 雅晴、南極産菌類の低温適応戦略の解明とそのバイオテクノロジーへの応用、生物学
フォーラム、2017.8 (東京都、新宿区)
辻 雅晴、田邊 優貴子、中澤 文男、WF Vincent、内田 雅己、カナダ北極・エルズミ
ア島氷河後退域における菌類の多様性と南北両極アイスコアに眠る菌類の分離について、雪
氷研究大会、2017、9 (新潟県、十日町市)
星野 保、辻 雅晴、肖 楠、工藤 栄、湯本 勲、南極産担子菌酵母の環境適応とその産
業利用、第 18 回極限環境生物学会大会、2017、11 (茨城県、つくば市)
辻 雅晴、極地に住む菌類とその排水処理、酒類醸造への利用、2018 年日本生物工学会賀詞
交換会、2018、1 (東京都、渋谷区)
辻 雅晴、中澤 文男、伊村 智、南北両極氷床コアに眠る菌類、第 8 回極域シンポジウム、
2017、12 (東京都、立川市)
辻 雅晴、田邊 優貴子、WF Vincent、内田 雅己、カナダ高緯度北極 エルズミア島におけ
る菌類の多様性、第 8 回極域シンポジウム、2017、12 (東京都、立川市)
辻 雅晴、低温ストレスにより誘導される南極産担子菌酵母が持つ二次代謝産物の探索、第 69
回日本生物工学会大会 2017、9 (東京都、新宿区)
Tsuji M、Cold adaptation strategy of Antarctic basidiomycetous yeast、7th Symposium
on Polar Science、2016、11 (東京都、立川市)
辻 雅晴、南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の低温ストレス反応、第 68 回日本生物工学
学会大会 2016、9 (富山県、富山市)
中島智美、竹内望、植竹淳、田邊優貴子、辻雅晴、宮内謙史郎、岡本智夏、北極圏とアジア
地域における雪氷藻類の種構成と色素の多様性、雪氷研究大会 2016、9 (長野県、松本市)
Nakashima T, Takeuchi N, Uetake J, Tanabe Y, Tsuji M, Miyauchi K, Okamoto C、
Geographical variations in pigment compositions of snow algae in Japan、Goldschmidt
2016、6、神奈川県、横浜
中島智美、竹内望、田邊優貴子、辻雅晴、植竹淳、宮内謙史郎、岡本智夏、日本とアラスカ
の山岳地域に見られる赤雪の雪氷藻類の細胞形態と色素構成の比較、Japan Geoscience
Union Meeting 2016、5 (千葉県、幕張)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：辻 雅晴

ローマ字氏名：TSUJI, Masaharu
所属研究機関名：国立極地研究所
部局名：研究教育系
職名：特任研究員
研究者番号（8桁）：70756923

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。