

平成22年6月30日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20870044  
研究課題名（和文）海底地下生物圏における未知真菌群集の解明とその分離  
研究課題名（英文）Investigation and isolation of unknown fungal groups in subsurface biosphere below the sea-floor.

研究代表者  
長野 由梨子（NAGANO YURIKO）  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポスドクトラル研究員  
研究者番号：30512917

研究成果の概要（和文）：深海底泥・地殻中における真菌多様性の調査を行い、海底地下生物圏における未知真菌群集の多様性が予想以上に富んでいること、海底地下奥深くまでに及んでいること、またその新規性を初めて明らかにした。本研究では、深海底堆積物試料を始め、深海環境から採取された海綿や貝類、海底に沈んでいた海藻などの生物試料からの真菌培養分離にも成功した。100株を超えるこれら分離株について、同定試験や抗微生物物質スクリーニング等を行った。抗微生物物質を産生する株も数株確認できており、今後、応用研究へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that unknown fungal communities exist in deep subsurface ecosystems with unexpected diversity and novelty. More than 100 fungal species were isolated from deep-sea sediments, deep-sea sponges, shellfishes, sea plants lying on deep-sea floor and other organisms collected in deep-sea environments. All species were identified and screened for antimicrobial agents. As some isolates appear to produce antimicrobial agents, this has great potential for future application research.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,320,000 | 396,000 | 1,716,000 |
| 2009年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 総計     | 2,480,000 | 744,000 | 3,224,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：極限微生物、菌類、深海環境、地下生物圏、海洋資源

## 1. 研究開始当初の背景

近年、海洋地殻内における「地下生物圏」の存在が注目され、その生態系の解明や新規微生物の探索、有用性の研究が進められている。

地下空間は、暗黒・高圧・低栄養といった極限的環境下にあり、そのような環境下に存在する生物は地表生物とは異なった特殊な生理・生態を持つ事が多い。これまでの研究で、

メタンを産生するメタン菌や硫酸還元菌、重金属還元好熱菌、超好アルカリ菌等、陸域表面に生息する微生物の分類上の常識を打ち破るような新奇性を有す細菌が多数発見されている。しかし、地下生物圏研究において、その対象の中心は原核生物であり、真核生物、特に真菌に関する報告は非常に少ない。真菌は地球上の多くの生態系において、主要なバイオマスとして存在し、大変重要な役割を担っている。特殊な生態や生理機能をもった真菌や進化上重要な位置にある真菌が地下生物圏に潜んでいる可能性は高い。世界に先駆けて、地下生物圏における真菌の存在や生態、またその役割を解明することは大変意義のある研究と考えられる。

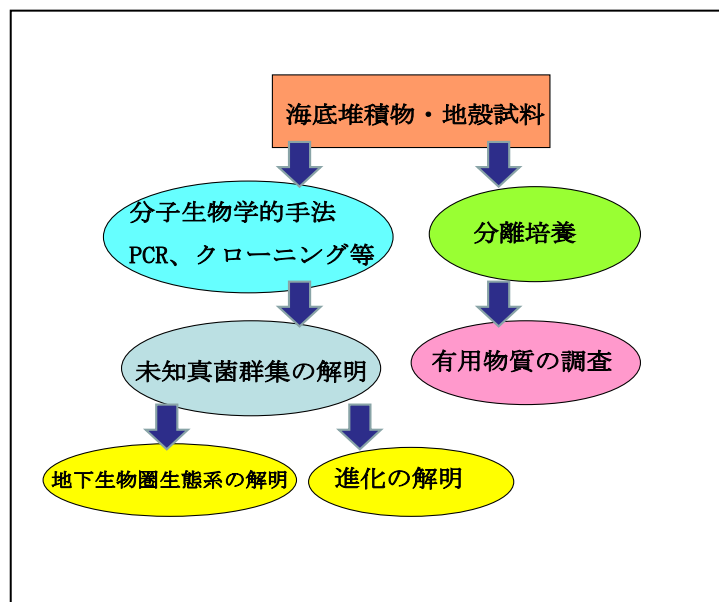
## 2. 研究の目的

本研究は海底地下生物圏における未知真菌群の解明とその分離を目的としたものである。深海堆積泥・地殻コア試料から直接DNAを抽出し、分子生物学的な手法で地下生物圏における真菌群集の解明を進めると共に、それら未知真菌群の培養分離を可能とするための特殊な培地、これまでに行われていない嫌気培養も含めた培養法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) まずは日本近海のメタンハイドレート層や深海底熱水活動域、世界最深部マリアナ海溝等、研究価値の高い場所から採取された海底堆積物中のDNAを抽出し、分子生物学的な手法を用いて真菌由来のrDNAやmtDNAの解析を行う。どのような真菌種がどのような場所に存在するのか、その傾向を明らかとする。メタンハイドレート層に特異的な真菌群の有無や深度・地質の違いによる真菌群の変化、細菌等他の微生物群との相関関係などを考察する。次に、検出された真菌が化石DNAであるのか、本当に棲息している菌であるのかを、生菌のみを染める染色法や真菌の細胞膜に特異的な主要構成成分であるエルゴステロールの定量によって検証する。

(2) また分子生物学的な手法と平行して、海底堆積物を様々な培地にプレーティングする。遺伝子解析によって示唆された新規の菌を分離するために培地、培養法を工夫し、海底堆積物からの真菌分離に適した培養法を明らかとする。培養によって分離された真菌については、遺伝子系統解析を含め様々な試験を行い、その性状を明らかにする。これらの結果と分子生物学的に解析したデータを総合的に分析し、地下生物圏における真菌の役割や真菌群のメタンハイドレート生成への関与、さらには真核生物進化の解明への糸口とする。



## 4. 研究成果

(1) 異なる5地点、10サンプルの深海堆積物と研究掘削船「ちきゅう」によって得られた海底下4.5m～40mの地殻試料中の真菌多様性を調査した結果、真菌は水深1万メートルに達する深海底泥中や、海底下40

m地点からも検出された。その多様性は予想以上に富んでおり、また海底下奥深くまで及んでいる事が明らかとなった。深海底泥試料からは地表に広く分布する既知の種も同定されたが、その多くは既知のデータベースとは全く相同性を示さない、もしくは低い相同

性を示す新規性の高いものであった。これらの配列の 5.8S rRNA 保存領域をもとに系統解析を行ったところ (図 2)、深海底泥には原始的な性質をもった進化上重要なグループに属する真菌が多く存在する事が明らかとなった。そのいくつかは、ツボカビ門類に

属する *Rozella allomycis* とクレードを形成した。*Rozella* 属は、真菌の中で最も初期に分岐した種として知られ、それらに近縁な種が深海環境中に見つかった事は、真菌の初期進化を考える上で非常に興味深い。



図 2 深海底堆積物由来真菌の系統解析  
赤字：深海底泥由来 ★：新規性の高い配列

また、採泥場所や深度にかかわらず、ほとんどの試料から検出された配列も存在した。この新規性の高い配列グループ (DSF-Group1) は、子嚢菌類に属し、最も近縁なのは *Candida* 属 (70%) であることが明らかになっている。この DSF-Group1 と高い同一性を示すものが、中国南海域のメタンハイドレート層やカリフォルニア湾の嫌気バクテリ

アマット (いずれも深海環境) からも検出されており、この配列をもった真菌は深海環境中に広く分布している事が推測された。DSF-Group1 は深海で特殊に適応、もしくは進化した真菌である可能性も高い。これらの結果は、口頭発表として国際学会 Fungal Genetics Conference 2009 に選出され、Eukaryotic Cell Outstanding Young

Investigator Award を受賞した。この事からも深海底下生物圏における真菌研究の重要性が伺える。

(2) 深海底堆積物、地殻、深海生物を分離源として様々な方法で真菌の分離を行った。従来の寒天培地の表面に試料を塗る方法ではなく、寒天培地が固まる直前に直接試料を混ぜ込んで固めたものを培養することで、真菌の分離効率をかなりあげることができた。100株を超える分離菌のほとんどは子嚢菌に属した。培養は4度、15度、20度、30度、37度で行ったところ、ほとんどの分離株の至適生育温度は20度~30度であった。37度で生育できるものは少なく、4度培養下では、成長は著しく遅かった。新種の真菌の分離にも成功した。そのほとんどは子嚢菌に分類された。嫌気培養によるツボカビ門類の分離を試みたが、本研究の研究期間中には分離に至らなかった。しかし、地殻試料を2年間に渡り、嫌気リアクター培養している培養液中の真菌由来DNAを調べたところ、ツボカビ門類に分類される配列が多数検出された。この結果は深海環境中にはツボカビ門に属する嫌気性真菌が存在するのではないかという本研究の仮説を裏付けるものであった。

本研究で培養分離できた真菌と、クローン解析によって同定された真菌の多様性には大きな差があった。培養分離では子嚢菌と担子菌酵母のみが分離できた。一方、クローン解析では子嚢菌、担子菌の他にも原始的な性質をもったツボカビや、接合菌類に属するクローンが多く検出された。今後は、サンプル数を増やし、さらに分離培養法の工夫をして、クローン解析によって存在が示唆されているツボカビ門類の培養分離を成功させたい。深海環境から嫌気性真菌の分離に成功すれば世界で初めての例となる。深海・地殻環境中の真菌が多様性に富んでいることが本研究によって明らかとなったが、深海環境における真菌ワールドの広がりやその役割は私たちの想像をはるかに超えるものと考えられる。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y, Nunoura T, Takami H, Miyazaki J, Takai K and Horikoshi K.  
Fungal diversity in deep-sea sediments—the presence of novel fungal groups.

Fungal Ecology, 査読有, 2010 [In press]

② Miyazaki M, Nagano Y, Fujiwara Y, Hatada Y and Nogi Y.

*Aquimarina macrocephali* sp. nov., isolated from the sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan.

IJSEM, 査読有, 2009 [In press]

[学会発表] (計8件)

① Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y, Nunoura T, Takami H, Miyazaki J, Takai K and Horikoshi K.

Discovery of the unknown fungal group that is distributed in global deep-sea environments.

The 3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists, Gothenburg, Sweden, 30 June 2009

② Nagano Y, Hatada Y, Nagahama T, Nunoura T, Takami H and Horikoshi K.

Fungal diversity in deep-sea sediments – A whole new world?

The 25<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, USA, 18 March 2009

③ Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y, Nunoura T, Miyazaki J and Takai K.

伊豆・小笠原海溝最深部 (9,760m) 海底堆積物中における未知真菌群集の調査

Blue Earth 2009, Tokyo, Japan, 13 March 2009

④ Fujikura K, Okutani T, Nagahama T, Nogi Y, Lindsay DJ, Yamamoto H, Kitazato H, Nagano Y, Takaki Y, …他40名

日本における海洋生物の多様性 – Census of Marine Life –

日本ベントス・プランクトン学会, Hokkaido, Japan, 18 October 2009

⑤ Nagahama T, Takahashi E, Nagano Y, Miyazaki M, Nogi Y and Horikoshi K.

深海域からのツボカビ様遺伝子の検出と多様性

日本菌学会第53回大会, Tottori, Japan, 20 August 2009

⑥ Hatada Y, Nagano Y, Mori K, Konishi M and Ohta Y.

深海の微生物に有用酵素を求めて  
第12回 マリンバイオテクノロジー学会大会, Tokyo, Japan, 31 May 2009

⑦Hatada Y, Nagano Y, Konishi M and Ohta Y.

Industrially relevant enzymes from the deep-sea and the host-vector system for their hyper-production

BIT Life Sciences' 2<sup>nd</sup> Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009, Seoul, Korea, 6 April 2009

⑧ Nagahama T, Takahashi E, Nagano Y, Miyazaki M and Nogi Y.

メタン冷湧水域からの Basal fungal lineage の検出と多様性

Blue Earth 2009, Tokyo, Japan, 13 March

2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 由梨子 (NAGANO YURIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号 : 30512917

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者