

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月25日現在

機関番号：47120

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570105

研究課題名（和文）低酸素環境に潜む初期菌類群「LKM11クレード」の実像と進化を探る

研究課題名（英文）Exploring evolution and figure of early fungal clade “LKM11” in oxygen-depleted environment

研究代表者

長濱 統彦（NAGAHAMA TAKAHIKO）

東筑紫短期大学・食物栄養学科・講師

研究者番号：10359169

研究成果の概要（和文）：西日本8ヶ所の湖沼堆積物を採取し、菌類DNAを解析することで、菌類初期進化の解明を試みた。菌類特異的PCRによる培養非依存法により、大量の新規菌類多様性を見出した。400系統型が真菌に関連し、うち213が97%基準で新規系統型であった。非Dikarya菌類は53.3%を占め、うち74.8%が新規系統型と推定された。LKM11系統型は全て新規であった。西日本の湖沼環境に存在する初期菌類系統は、全真菌系統型の過半数を占め、予想を超えた大きな多様性と新規性を示していた。

研究成果の概要（英文）：For exploring early evolution of fungi, we investigated fungal diversity in sediments collected in eight lakes in west Japan. By using culture-independent method with fungal-specific PCR of SSU rDNA, we revealed an large extent of novel fungal diversity in lacustrine environment. Four hundreds fungal phylotypes were obtained from PCR clone libraries of six lakes successfully amplified. Novel (<97% identity) phylotypes are 213 (53.3%) in all fungal phylotypes. There were 187 phylotypes (46.8%) related to Dikarya (Ascomycota + Basidiomycota). Whereas, Non-Dikarya fungi (Chytridiomycota + Blastocladiomycota + LKM11 etc) were 53.3%, 74.8% of which were estimated to be novel phylotypes with <97% affinities. All LKM11 phylotypes were novel. Early fungal lineages occupied a majority of all fungal phylotypes from the lacustrine environment in west Japan and indicated an unexpected diversity and novelty.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：菌類・LKM11クレード・初期進化

1. 研究開始当初の背景

菌類（真菌類）の初期進化は、国際共同研究AFTOL Projectを通して重点的に取り組まれている研究テーマであるが、多くが未解決で

あり、これまでの報告も仮説の域を出ない（Hibbett et al 2007）。一方で、水環境における分子生態学的なアプローチから、菌類の初期系統に近縁な未知配列が見出されてき

ている。そのなかでも最も興味深いもののひとつが LKM11 クレードである。これは 1999 年に van Hannen らにより定義された未培養系統群 (Clone group) であり、主に水圏、特に低酸素環境に関連して出現すると考えられている。現在までのところ、湖底環境 (Slapeta et al 2005; Lefranc et al 2005; Takishita et al 2007a; Lepere et al 2006, 2007, 2008; Mangotet al 2009)、人工の水生態系システム (van Hannen et al 1999; Laurin et al 2008)、海底環境 (Savin et al 2004; Bass et al 2007; Takishita et al 2007b) からの報告がある。本菌群は、申請者らによる深海底泥中の DNA に基づく菌類 PCR クローン解析 (Nagahama et al 2009) においても検出されており、深海環境にも普遍的に分布していると考えられる。LKM11 クレードに注目すべき理由を以下に述べる。

(1) 菌類進化上、最初期に分岐した系統群 (の有力候補) である

菌類に関する最新の系統関係 (James et al 2006) において、ロゼラ (Rozella) 属菌種と微胞子虫 (Microsporidia) が最初期に分岐したと考えられている。LKM11 クレードはこのうちロゼラと単系統を形成することが最近わかってきた (Lara et al 2009)。ロゼラはツボカビ寄生性 (のツボカビ) という奇妙な生活環を持ち、既知のツボカビとは共有形質に乏しい。LKM11 クレードはこれらをリンクする表現形質を有することが期待されると同時に、最も古い菌類系統の有力候補である。この菌群が菌類の初期進化を理解するために重要な位置を占めるのは間違いないと考えられる。

(2) 門に相当する多様性がある

これまで LKM11 クレードとして報告されているものの系統関係を図 1 に示した。報告数は限られているにも関わらず、系統分類学的には門に匹敵する多様性を有している。広範なサンプリングを実施することにより、更なる生物多様性と特異性、さらに地理学的分布が明らかになると予想される。

(3) 低酸素環境に出現し、多くの菌類とは異なる代謝系を持つ可能性がある

無酸素環境に適応した絶対嫌気性真菌としては、ルーメン菌類と微胞子虫が知られている。どちらもミトコンドリアの代わりに、Hydrogenosome や Mitosome を持ち、寄生・共生的な生活環を有する。一方、LKM11 クレードは水圏の堆積物に出現することから、自由生活種である可能性が高く、その培養もそれほど難しくはないと予想される。絶対嫌気性と通性嫌気性、両方の可能性がある。さらに系統的な多様性から考えて、多様な代謝系

を有する可能性がある。

(4) 未だ分離に成功しておらず、その実像が示されていない

唯一、SSU rRNA 遺伝子からのみ検出されている系統群である。残念ながら多くの菌類研究者にはその存在すら知られていない。純粋培養やその形態が観察されたという報告もない。従って、その生活環や生態的役割は全く未知である。

(5) さまざまな水環境、特に湖底 - 深海環境から高頻度に出現している

菌類の陸上進出以前、それらの菌類はどのようなものであったか、陸上進出においてどのような過程を経ていたのか。それらの示唆を研究の過程から得ることができるとも知れない。例えば、もし LKM11 クレードが菌類の祖先型であったとすると、深海からまず湖沼へ進出し、その後陸上へ進出し、現在の多様な菌類へ進化した、という進化仮説が描けるかも知れない。LKM11 クレードは極めて多様で新規性が高く、その進化的位置付けは非常に興味深いものである。本研究のなかで実施される、多様性解析、純粋培養、実像の観察や代謝解析から得られる情報は科学的に高いインパクトを持ち、湖底・深海環境の生態系・食物連鎖を知る上で不可欠であるのみならず、菌類の起源と初期進化、ひいては動物との共通起源 (Ophisthokonts) の進化を考える上で重要である。また、菌類の多くは生態的には分解者として働き、難分解性物質の分解に大きな役割を果たしている。本菌群も応用面に高い能力を秘めている可能性がある。

2. 研究の目的

低酸素環境の水圏堆積物から普遍的かつ多量に検出される未培養系統群のひとつに、LKM11 クレードがある。このクレードは、菌界 [Kingdom Fungi] に含まれる一方、「門」に相当する高い多様性と、菌類進化上最深部における分岐が示唆されており、菌類の初期進化を知るうえで極めて重要である。一方、これまで分離培養はおろか、実像の観察すら行われておらず、生態は謎に包まれている。LKM11 クレードの遺伝的・形態的多様性と地理学的分布の調査、直接観察および純粋培養、さらに代謝的・生態的特異性の解明、が本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究は、(1) LKM11 クレードを検出するための効率的なツールの開発、LKM11 クレードの定義の確立、(2) 湖沼・淡水・深海環境からの幅広いサンプリングと Specific PCR と Real-Time PCR による LKM11 クレードの検出

法の効率化、(3)クローニングと DGGE 法による微生物群集構造および多様性解析、(4)FISH 法による LKM11 クレードの視覚化、(5)嫌気・微好気条件下の増殖と純粋培養の試み、(6)EST 解析を用いた代謝的・生態的特異性の予測、の4段階から成る。(1)、(2)および(3)の一部を実施した。それ以外について研究年度内での実施が叶わなかった。

(1)既知の LKM11 クレード配列は現在約 20 が知られている。それらの整列配列より特異的プライマーをデザインし、それが実サンプルにおいて有用であるかどうか検証する。現在唯一報告されている LKM11 特異的プライマー (LKM11_01 TAC TGTCAC TAC CTC GCC、LKM11_02 TGG TCC TCA AAC CAA C) が、湖沼環境のみならず海洋環境や他の様々な水環境において有用であるか検証する。また Walking PCR により SSU rRNA 以外の rRNA 領域を決定する (既存サンプルを用いる) それらを基に、既知データベース内に、他遺伝子 (特に LSU rRNA 遺伝子) において、LKM11 クレードが含まれるものがないか調べる。さらにその配列中に特異性の高い領域がないかどうか調べる。また、異なる rDNA 領域間での同一性を確保するため、領域を横断して増幅可能な PCR プライマーをデザインする。同様に DGGE に適した PCR プライマー、FISH プロブをデザインし、その検討を行う。

(2)(3)日本国内の湖沼・淡水・深海環境から継続的なサンプリングを実施し、できるだけ多くのサンプルを確保する。より多くのサンプルからの検出を試みるため、LKM11 特異的 PCR プライマーを用いた PCR により、多様な環境から効率的に本系統の同定を行い、その系統を解析する。(3)LKM11 クレードが検出されたサンプルから、LKM11 特異的プライマーおよび通常のユニバーサルプライマーを用いて真菌および LKM11 クレードの多様性を調査する。底泥サンプルからは Isoil DNA Extraction Kit (ニッポンジーン)を用いて、DNA 抽出を行った。PCR 増幅はプライマーとして

SSU82F (GAAACTGCGAATGGCTC)
SSU1498R (CACCTACGGAAACCTTGTTA)
を用いた。
これらは菌類特異的プライマーであり、増幅長が約 750bp と短いものの増幅効率が良かった。
1%アガロースゲル電気泳動により増幅が観察されたサンプルは、S.N.A.P UV-Free Gel Purification Kit (Invitrogen) を用いてゲルからの切り出しと DNA 抽出精製を行ない、TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて PCR 断片の T-ベクターへのライゲーションと大腸菌への形質転換、青白選別法によるコ

ロニーの選別、M13 プライマーを用いたインサートチェックを行なった。これにより適切なサイズの断片の導入が確認されたクローニングについて、ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (PE Biosystems) を用いて塩基配列の決定を行なった。決定された配列は BLASTn により近縁配列を検索した。また取得配列の系統位置を明確にするため、取得配列と近縁配列は代表的な菌類種の配列と共に整列された後、系統関係の推定に用いられる。これによりサンプルに存在したと予想される菌群を予測する。整列配列には Clustalw/x を、系統樹推定には PAUP4.0*、Model test、MrBayes、MrModel test 等を用いた。以上手順により、各湖沼底泥環境における真菌類の分布が指標 DNA レベルで明らかになると考えられた。

4. 研究成果

(1)LKM11 クレードを検出するための効率的なツールの開発

既知の LKM11 プライマーの増幅範囲について検討を行った結果、湖沼性の一部系統のみ増幅可能であることが予想された。その後、本研究において取得した複数の湖沼底泥サンプルを用いて、現在報告されている特異的プライマーの有用性を検証したところ、ほとんど増幅が見られなかった。湖沼性の LKM11 クレードの多様性だけでも事前の予想を遥かに超えるものがあると考えられた。他研究グループの論文発表により、LKM11 クレードは、"Cryptomycota" という新たな真菌分類群として位置づけられ、極めて普遍的かつ多様なグループであることが認識された。これにより、LKM11 クレードのユニバーサルかつ特異的なプライマーのデザインは相当難しいことが予想されてきたため、今後は "Cryptomycota" の多様な系統群のそれぞれを可能な限り調査・認識し、報告した後、個々についてプライマーのデザインを行ったほうがよいと考えられた。また一方で新たに深海環境由来の系統群を増幅するプライマーの作成を試みていたが、深海性始原菌類の多様性はさらに大きく、そのターゲットを絞るためには、同じようにまずその多様性を理解することが必要であると考えられた。よって (2)(3) の理解が本テーマの遂行に必須であるため、それを優先として研究を行うこととした。

(2)湖沼・淡水・深海環境からの幅広いサンプリングと各種 PCR 手法による LKM11 クレートの検出法の効率化

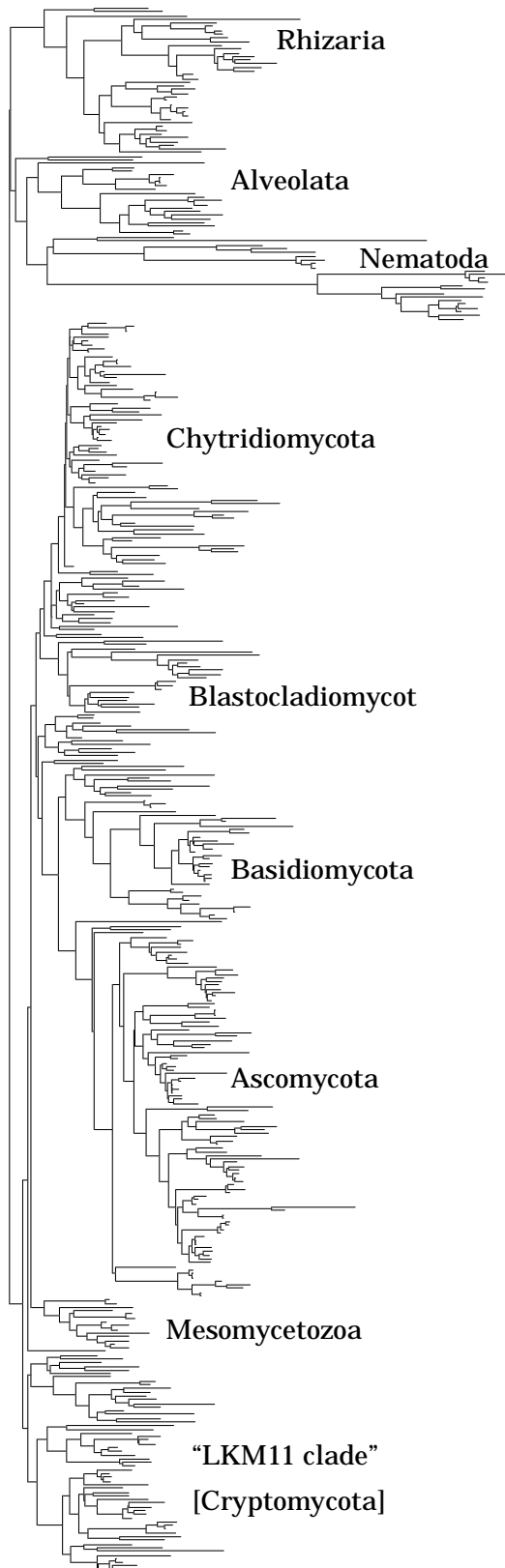


図 1 湖沼底泥中に存在した真菌 DNA と類縁系統から推定された系統関係

- 蘭牟田池 (鹿児島県)
- 住吉池 (鹿児島県)
- 弥栄湖 (広島県大竹市)
- 御池 (宮崎県都城市)
- 白岳池周辺ため池 (長崎県松浦市)
- 常盤湖 (山口県宇部市)
- 豊田湖 (山口県下関市豊田町)
- 蟠竜湖 (島根県益田市)

以上 8 湖沼について底泥のサンプリングを行った。宮崎県・鹿児島県境に位置する大浪池、大幡池、白紫池、六観音御池、不動池のサンプリングを予定していたが、新燃岳噴火により断念した。蘭牟田池の泥炭堆積物から抽出した DNA より菌類特異的プライマーを用いて、LKM11 クレートの検出を試みたが、Dikarya に属する菌類クローンのみが見出され、そのなかには *Fusarium oxysporum* などが含まれていた。*F. oxysporum* は脱窒能を有する真菌として知られているが、その発現には酸素の抑制が必要であることがわかっている。湖沼底泥環境は真菌が脱窒を行う際に必要とする好気環境が確保されている可能性があり、より詳細な調査が期待される結果となった。また深海性 LKM11 クレートの調査の過程で、深海菌類と LKM11 の多様性・応用可能性が明らかになったので、論文として発表した。

今後、季節変動を調査するため、継続的に調査可能なポイントを探っていく。さらに、各湖沼および深海底泥サンプルについて、菌類特異的プライマーを用いての PCR 増幅を実施し、8ヶ所中6ヶ所で菌類の存在を確認した。これらをそれぞれ 96 クローンずつ取得し、シーケンシングしたところ、460 種類の phylotype を得た。これらは 99% の相同性でクラスタリングしたところ、202 の phylotype となった。460 phylotype のおおまかな帰属を blastn により推定した。全く不明なものが 21 phylotype (4.5%) あり、これらの相同性は全て 88% 以下であった。加えて、Rhizaria や Alveolata など菌類以外に属するものが、39 phylotype (8.5%) 存在した。菌類に含まれるものの中では、Dikarya (高等菌類) が 187 phylotype 含まれ、うち担子菌類は 27 phylotype であった(残りは子囊菌類)。このなかには深海クローンとして普遍的に現れる *Malassezia* クローンも含まれた。非 Dikarya 菌類としては 213 phylotype あり、うち LKM11 に明確に親和性を持つものとして 38 phylotype が出現した。それ以外のものとしては、大西洋の深海熱水口から出現したツボカビの系統と近縁 phylotype が湖沼底泥からも現れた。これらは深海底泥と湖底泥の真菌進化上の接点が示唆されている可能性がある。湖沼底泥のひとつの大きな特徴は未知

系統群の割合の多さである。全体としてみると、所属不明であったもの、菌類以外の類縁を示したものを合わせて60phylotype以外の400phylotypeのうち、213phylotype(53.3%)が97%以下の相同性を示し、299phylotype(74.8%)が98%以下の相同性を示した。Dikarya菌類では、既知の配列(クローン配列を含む)に対して97%以上の相同性を示したものが76%にのぼったのに対し、非Dikarya菌類ではたったの20%であった。非Dikarya菌類では環境DNAレベルにおいて膨大な数の未知系統が地球環境、特に低酸素水環境中に潜んでいると推測された。そしてそのほとんどが培養されておらず、その生態も全くが未知のままとなっている。今後は、この未知なる系統群のメタゲノミックな解析や一部の培養可能種(寄生種である)の詳細な生理生化学的検討を通じて、予測された代謝系を基に培養への取り組みを進めていくべきであると考えられた。

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11件)

Nagano, Y. & Nagahama, T.

Fungal diversity in deep-sea extreme environments

Fungal Ecology

査読有、5巻、2012、463-471、

DOI : 10.1016/j.funeco.2012.01.004

Kobayashi, H., Hatada, Y., Tsubouchi, T., Nagahama, T. & Takami, H.
The Hadal Amphipod *Hirondellea gigas*
Possessing a Unique Cellulase for
Digesting Wooden Debris Buried in the
Deepest Seafloor

PLoS ONE

査読有、7巻、2012、e42727

DOI : 10.1371/journal.pone.0042727

Abdel-Wahab, M.A. & Nagahama, T.

Halosarpheia japonica sp. nov.
(Halosphaerales, Ascomycota) from marine
habitats in Japan.

Mycological Progress

査読有、11巻、2012、85-92

DOI ; 10.1007/s11557-010-0731-0

Miyazaki, M., Koide, O., Kobayashi, T.,
Mori, K., Shimamura, S., Nunoura, T.,
Imachi, H., Inagaki, F., Nagahama, T.,
Nogi, Y., Deguchi, S. & Takai, K.
Geofilum rubicundum gen. nov., sp. nov.,
isolated from deep seafloor sediment

International Journal of Systematic and
Evolutionary Microbiology

査読有、62巻、2012、1075-1080

DOI : 10.1099/ijms.0.032326-0

Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y.,
Abdel Wahab, M. A. & Miyazaki, M.
Molecular evidence that deep branching
fungi are major fungal components in deep
sea methane cold seep sediments

Environmental Microbiology

査読有、13巻、2011、2359-2370

DOI : 10.1111/j.1462-2920.2011.02507.x

Konishi, M., Nagahama, T., Fukuoka, T.,
Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D. &
Hatada, Y.

Yeast extract stimulates production of
glycolipid biosurfactants,
mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma*
hubeiensis SY62

Journal of Bioscience and Bioengineering

査読有、111巻、2011、702-705

DOI : 10.1016/j.jbiosc.2011.02.004

Baba, A., Miyazaki, M., Nagahama, T.
& Nogi, Y.

Microbulbifer chitinilyticus sp. nov. and
Microbulbifer okinawensis sp. nov.,
chitin-degrading bacteria isolated from
mangrove forests

International Journal of Systematic and
Evolutionary Microbiology

査読有、61巻、2011、2215-2220

DOI : 10.1099/ijms.0.024158-0

Abdel-Wahab, M. A. & Nagahama, T.
Gesasha (Halosphaerales, Ascomycota), a
new genus with three new species from the
Gesashi mangroves in Japan

Nova Hedwigia

査読有、92巻、2011、497-512

DOI : 10.1127/0029-5035/2011/0092-0497

長野由梨子 & 長濱統彦.
深海環境における真菌多様性

高圧力の科学と技術
査読有、20 巻、2010、321-329
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jshpreview/20/4/20_4_321/_pdf

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

Fungal Ecology
査読有、3 巻、2010、316-325
DOI : 10.1016/j.funeco.2010.01.002

Konishi, M., Fukuoka, T., Nagahama, T.,
Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D. &
Hatada, Y.
Biosurfactant-producing yeast isolated
from Calyptogena soyoae (deep-sea
cold-seep clam) in the deep sea

Journal of Bioscience and Bioengineering
査読有、110 巻、2010、169-175
DOI : 10.1016/j.jbiosc.2010.01.018

〔図書〕(計1件)

Nagahama, T. & Nagano, Y.
Cultured and Uncultured Fungal Diversity
in Deep-Sea Environments
In Biology of Marine Fungi,
Progress in Molecular and Subcellular
Biology,
Edited by C. Raghukumar
2012、173-187
Springer Berlin Heidelberg

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長濱 統彦 (NAGAHAMA TAKAHIKO)
東筑紫短期大学・食物栄養学科・講師
研究者番号：10359169

(2) 研究分担者

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・研究員
研究者番号：30512917

宮崎 征行 (MIYAZAKI MASAYUKI)
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・技術研究副主事
研究者番号：50399573