

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770098

研究課題名(和文) 深海・地殻環境中に高頻度出現する新奇・未培養真菌群の実態とその生態学的意義の解明

研究課題名(英文) Identifying the unknown novel fungal groups frequently detected in deep-sea and subsurface environments and clarifying their ecological role

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・研究員

研究者番号：30512917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタン冷湧水域、深度1万mの海溝域、鯨骨域といった特殊な深海環境から、300株以上に及ぶ真菌の分離に成功した。また、single cell genomicsや次世代シーケンサー等による網羅的な真菌多様性解析により、数多くの新規真菌群が深海環境中に存在する事を明らかにした。中でもメタン冷湧水域の堆積物中から高頻度に検出された原始的な真菌群は、非常に新規性の高いグループである事が示唆された。本研究を通して多くの新規真菌の分離、新規未培養真菌群の検出、深海からのみ分離が報告されている真菌のEST解析に成功し、これまで謎に包まれていた深海環境中の真菌の多様性やその生態について解明が進んだ。

研究成果の概要(英文)：Over 300 fungal species were isolated from unique deep-sea environments, including methane cold seeps, 10,000m deep-sea trench, and whale fall sites in this study. Also, many novel unknown fungal groups were revealed in deep-sea environments by analyzing fungal diversity with single cell genomics and next generation sequencer. It was suggested that the group frequently detected from methane cold seep was highly novel and an early diverged group. This study led us to understand fungal diversity and its role in deep-sea environments, through isolating many new and previously unknown species, detecting unknown fungal groups, and using expressed sequence tag (EST) analysis of fungi reported only from deep-sea environments.

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：真菌類 深海 メタン冷湧水域 Cryptomycota

1. 研究開始当初の背景

深海や地殻環境においてその研究対象の中心はバクテリアやアーキアといった原核生物であったが、近年、深海底堆積物・地殻中における真核微生物、特に真菌類の存在が注目を集めている。これまでに、研究代表者を含め、中国、フランス、イギリス、アメリカの研究グループによって、新規性の高い真菌類の存在が相次いで深海・地殻環境から報告されている。しかし、まだ研究報告数も少なく、深海・地殻内生態系における真菌類の実像やその多様性、役割、生態、生理機能については全くといって良いほど何もわかっていない。解明が進まない理由の一つに、深海・地殻環境中から検出される多くの真菌類は培養に成功していない未培養群であることが挙げられる。これまでの調査では、深海・地殻環境中から検出できるクローンのうち、培養可能な系統はごく一部の子嚢菌と担子菌系酵母のみに限られ、全体の2割にも満たない。また、未培養系統のほとんどは既知のデータベースとは低い相同性を示す、非常に新規性の高い系統である事が明らかになっている。世界に先駆け、深海・地殻環境中に特異的に生息していると考えられる未培養真菌群の培養分離や詳細な代謝系を解明する事は、極限環境における真菌の役割や生態を理解する上で非常に重要である。これまで「好圧性」「嫌気性」といった深海由来真菌は、期待されながらもまだ見出されていない。そのような性質を持った極限真菌の発見・分離に成功すれば世界初であり、その生物学上のインパクトは大きい。また真菌は古くから食品や医薬品に欠かせない有用物質産生菌として知られており、深海・地殻由来新規真菌類から発見される新規生理活性物質や遺伝子機能は、応用面にも非常に高い能力を秘めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海・地殻環境中に出現する未培養真菌群の形態的・生態的・代謝的・遺伝的特徴を明らかにし、「嫌気/低酸素」「高圧」といった極限環境に生息する真菌類の謎に包まれた実態とその生態学的意義を解明する事である。本研究では、深海・地殻環境中から高頻度検出される未培養真菌群に特に注目し、様々な分子遺伝学ツールと培養法を上手く組み合わせながら、その多様性や地理学的分布、生菌量の調査、FISH、培養分離による形態観察、EST・ゲノム解析による代謝系の解明を行う。

3. 研究の方法

深海底堆積物、地殻、深海生物試料中から直接 RNA・DNA を抽出し、真菌類に特異的な PCR プライマーを用いて定量 PCR を行い、真菌類の地理学的分布や多様性を調査する。解析結果と、試料採取地点の地理学的・地質学

的・生物学的情報等を比較し、深海・地殻環境中における真菌類の出現傾向やその役割・生態などを考察する。採取試料中から、培地組成を工夫した培地や、嫌気/微好気培養、高圧培養、低温培養など特殊な培養法を用いて真菌類の培養分離を試みる。深海環境に特有なユニークな特徴をもった真菌株が得られた場合には expressed sequence tag (EST)・ゲノム解析等を行い、その代謝的・生態的・遺伝的特徴を明らかにする。難培養グループは、マイクロマニピュレーター等による細胞分取や single cell genomics を行う。

4. 研究成果

(1) 研究試料のサンプリング

本研究では、メタン冷湧水域(相模湾初島沖)、海溝域(小笠原海溝)、鯨骨域(鹿児島野間岬)から堆積物や海水、深海生物のサンプリングを行った。また、研究協力者の協力により人為的に海底に沈めた木片のサンプリングも行う事ができた。

(2) 培養法による真菌多様性調査

様々な基質や培養条件下(固体/液体、好気/嫌気、高圧、メタンを含む培地、低温等)で、採取した試料から真菌類の分離を行った結果、メタン冷湧水域から200株以上、合計300株以上の分離株取得に成功した。これらの分離株の中には、これまで培養に成功していなかった系統群も含まれる。メタン冷湧水域と鯨骨域の底泥からは非常に高頻度で真菌が分離されたのに対し、深度1万メートル近い海溝域の底泥からは低頻度でのみ真菌が分離されたが、新種の割合が多かった。鯨骨化学合成生態域より分離された真菌群は他環境に比べ、糸状菌よりも酵母の数が多かった。また、分離された糸状菌はこれまでに他の深海底泥サンプルからは分離されていない種が多く、鯨骨に特有の真菌相が存在することがわかった。海底に人為的に沈められた木片からは、真菌が子実体を木片表面に形成した形で採集された。この菌は、これまでに世界で1例しか報告のない *Alisea longicolla* (図1)と同定され、これまでに深海環境からのみ報告がある事から深海性真菌の可能性が高い事が示唆された。

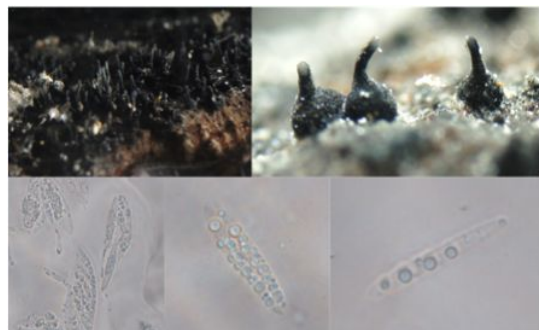


図1 *Alisea longicolla*

(3) 非培養法による真菌多様性調査

メタン冷湧水域のバクテリアマット、シロウリガイコロニー、シンカイヒバリコロニーといった化学合成生物の存在する特徴的な地点やそれ以外の6地点から堆積物を採集し、直接RNA・DNAを抽出、真菌特異的プライマーを用いたPCRを行った。その結果、用いたPCRプライマーによって結果は異なったがRNA、DNA共に6サンプル中のすべてから真菌由来クローンが検出された。検出されたクローンの多くは、既知菌とは相同性を示さない、非常に新規性の高い未知配列であった。系統解析により未知配列の多くは、ツボカビ門、2011年に新たに提唱されたキチン質の細胞壁を欠く最も原始的な菌類とされるCryptomycota門、そしてメタン冷湧水域由来のクローンのみで構成されるBasal Clone Group(BCG1)に属する事が示唆された。これら新規性の高い未知配列はRNAレベルでも検出が可能であり、深海環境中に実際に生息していると示唆された。

小笠原海溝域の調査では、これまでの環境PCR法に加え0, 200, 500, 1000, 5000, 9700mの深度別の海水を対象にsingle cell genomicsを行った。Single cell genomicsの真核単細胞生物への応用にはまだ問題点が残るが、数は少ないながらも非常に新規性の高い真核微生物配列を得る事に成功した。

(4) *Alisea longicolla*のEST解析

分離された新規性の高い菌の中でも、人為的に海底に沈められた木片から採取された『深海性』である可能性の高い*Alisea longicolla*に特に注目し、この菌のExpressed Sequence Tag (EST) 解析を行った。EST解析によって得られた遺伝子群の詳細な解析を行い、その代謝経路や木材分解関連酵素などの存在を明らかにした。深海環境での生息が確認されている真菌のEST解析が行われたのは世界でも初めてである。

本研究を通して多くの新規真菌の分離、新規未知真菌グループの検出、深海からのみ分離が報告されている深海真菌のEST解析に成功し、これまで研究の進んでいなかった深海環境中の真菌の多様性やその生態について解明が進んだ。今後は、化学合成生態系の存在する特殊な深海メタン冷湧水域環境から特異的に多量出現する原始的な真菌群(Cryptomycota, Basal Clone Group1(BCG1))に特に注目し、その実態や生態について解明していく予定である。

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3件)

Nagano Y and Nagahama T. Fungal

diversity in deep-sea extreme environments. *Fungal Ecology*, 2012, 5(4): 463-471 査読有り
DOI:10.1016/j.funeco.2012.01.004

Ohta Y, Nishi S, Haga T, Tsubouchi T, Hasegawa R, Konishi M, Nagano Y, Tsuruwaka Y, Shimane Y, Mori K, Usui K, Suda S, Tsutsui K, Nishimoto A, Fujiwara Y, Maruyama T and Hatada Y. Screening and Phylogenetic Analysis of Deep-Sea Bacteria Capable of Metabolizing Lignin-Derived Aromatic Compounds. *Open Journal of Marine Science*, 2012, 2:177-187 査読有り
DOI: 10.4236/ojms.2012.24021

Nagahama T, Takahashi E, Nagano Y, Abdel-Wahab MA, Miyazaki M. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 2359-2370 査読有り
DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02507.x

[学会発表](計9件)

Nagano Y, and Nagahama T. Cryptic fungal diversity in deep-sea environments. AMC2013& 13th IMFMS, China National Convention Center (CNCC), Beijing, China. 21st August, 2013 (招待講演)

長野由梨子、長濱統彦、深海の未知なる多様性“泳ぐカビ”、菌学会関東支部年次大会、日本大学、千葉県、2013年4月20日(招待講演)

Nagano Y, Nagahama T, Konishi M, Shimane Y, Mori K, Ohta Y, Hatada Y. Fungal diversity in deep-sea environments. 13th International Deep-sea Biology Symposium, Museum of New Zealand, Wellington, New Zealand. 5th December, 2012 (口頭発表)

Nagano Y, Nagahama T, Konishi M, Mori K, Shimane Y, Ohta Y, Hatada Y. Fungal diversity in deep-sea environments. BMS 2012 Fungal Interactions, University of Alicante, Alicante, Spain. 6th September, 2012 (招待講演)

長野由梨子、長濱統彦、小西正朗、森梢、嶋根康広、大田ゆかり、秦田勇二、深海極環境中の真菌多様性、第52回高圧討論会、沖縄キリスト教学院、沖縄県、2011年11月9日(ポスター発表)

Nagano Y. Fungal diversity in deep-sea environments. Joint Symposium between

MBRC (KIOST) & JAMSTEC, KIOST, Seoul,
Korea. 17th October, 2011. (招待講演)

Nagano Y, Takishita K, Nagahama T,
Watanabe H, Mori K, Konishi M, Ohta Y and
Hatada Y. Fungal diversity in deep-sea
methane cold-seep ecosystems. The 3rd
World Conference on Marine Biodiversity,
Aberdeen Exhibition and Conference Centre,
Aberdeen, U.K., 28th September 2011 (ポス
ター発表)

Nagano Y, Takishita K, Nagahama T,
Watanabe H, Mori K, Tsuruwaka Y, Konishi
M, Ohta Y, Hatada Y. Fungal diversity in
deep-sea methane cold-seep ecosystems.
IUMS 2011, Sapporo Convention Center,
Sapporo, Japan, 9th September 2011 (招待
講演)

長野由梨子、長濱統彦、秦田勇二、深海・
地殻内極限環境における真菌類の多様性、第
14回マリンバイオテクノロジー学会、グラ
ンシップ、静岡県、2011年5月28日(招待
講演)

〔図書〕(計2件)

Nagano Y, Nagahama T and Fumiyoshi Abe.
Cold-adapted yeasts in deep-sea
environments. Cold-adapted Yeasts:
Biodiversity, Adaptation Strategies and
Biotechnological Significance. Springer,
2014, pp.149-171

Nagano Y, and Nagahama T. Cultured and
uncultured fungal diversity in deep-sea
environments. Biology of marine fungi,
Springer, 2012, pp.173-187

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・研究員

研究者番号：30512917