

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450500

研究課題名(和文) 微好気培養法による未知水生菌類の探索と培養株の収集・保存

研究課題名(英文) Exploration, collection and preservation of the living cultures of unknown aquatic fungi by adopting semi anaerobic culturing methods

研究代表者

中桐 昭 (NAKAGIRI, AKIRA)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70198050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：淡水域および汽水域の低酸素環境に適応した真菌類の取得を目指し、2段階低酸素分離法や低酸素釣菌法で菌を分離し、培養性状を調べた結果、分離株の多くは高酸素菌(好気性菌)であったが、少数ながら、低酸素菌や中酸素菌(微好気菌)も分離できた。さらに、嫌気～微好気～好気の各条件で生育が変わらない広範囲菌が分離され、これらは低酸素環境に適応して生息できる菌類と考えられた。水生菌類では、淡水域からはSigmoidea sp.、汽水域からはLulwoana spp.などが高または高～中酸素菌として見いだされた。これらは未記載種と考えられ、新たな低酸素分離法により、未知の菌が取得できた可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aiming to isolate anaerobic or semi anaerobic fungi from fresh water and brackish water environments, the two-step low-oxygen isolation method and the anaerobic baiting method were applied. Culture test under different O<sub>2</sub> conditions revealed many of the isolates were aerobic species, but a few were anaerobic or semi anaerobic. They also include the wide-range fungi, which grow equally under the anaerobic, semi anaerobic and aerobic conditions. The latter fungi are probably adapted to lower oxygen environments. In the aquatic fungi, Sigmoidea sp., etc. from freshwater habitats and Lulwoana spp. from the brackish habitat, which were found high or high-mid oxygen fungi, were isolated. Because some of these fungi are undescribed species, the new isolation methods under low oxygen might be effective for exploring unknown group of fungi.

研究分野：菌類多様性、菌株保存

キーワード：低酸素 菌類多様性 水生菌類

### 1. 研究開始当初の背景

真菌類のうち高等糸状菌類と呼ばれる子囊菌および担子菌はこれまでにそれぞれ約 65,000 種、32,000 種が記載されているが、それらの一部は淡水、汽水、そして海水域に生息し、水界における植物遺体の分解や、物質循環に重要な役割を担っている。これまで、溪流や河川、海岸などの動水域 (lotic water) に生息する菌類を中心に分類や生態研究がおこなわれてきており、これまでに約 3000 種が報告されている。一方、池沼の堆積物の多い岸辺などの溶存酸素濃度が低い静水域 (lentic water) に生息する半水生菌 (aero-aquatic fungi) と呼ばれる菌類については、ごくわずかな種 (約 90 種) が報告されているにすぎない。この種数の少なさは、これまで真菌類の培養法として一般に用いられている好氣的培養法に問題がある可能性がある。

一方、陸生菌である *Fusarium oxysporum* のような一部の菌は無酸素あるいは微好気条件下で生存や生育が可能であることが明らかになっており、低酸素条件下で不完全な脱窒反応 ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) によって生活することが報告されている (Shoun & Tanimoto, 1991; 高谷・祥雲, 2005)。また、Medeiros et al. (2009) は、小川の低酸素域から分離された水生不完全菌 20 種のうち 12 種は溶存酸素濃度が低い低酸素条件 (4%) で生育可能であったこと、さらにその水生菌の中には高酸素条件よりも低酸素条件の方が多くの分生子を形成するものが含まれることを明らかにしている。さらに、最近では、池沼の底泥や深海の底泥という低溶存酸素環境から、メタゲノム解析によって、また、FISH 法により、ツボカビ類の *Rozella* 属に近く、真菌類の初期進化で分岐した可能性があることと指摘されている新規な系統群 Cryptomycota (もしくは、Rozellomycota) が存在することが報告された (Jones et al., 2011)。このように、自然界には低酸素環境に適応した菌類が存在し、しかも、未知の新規真菌類が生息している可能性がある。しかし、これまでの真菌の探索はもっぱら好気条件下での分離培養によるものであり、微好気条件のもとで出現してくる真菌類を探索、分離することは行われてこなかった。

本研究は、「菌類は、本来もっと息苦しい世界に生きているのではないか」という仮説のもとに、陸上よりもより低酸素化しやすい水界の低酸素環境に生息する未知の水生菌類を探索し、その分離培養株を得て、その性状や生活史を調査し、生物としての実体を明らかにするとともに、新たな遺伝資源を得ることを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では水界から得られるさまざまな基質を微好気～無酸素条件下で培養を行い、出

現する低酸素環境に適応した真菌類を分離し培養株を得ることを第一の目標とした。そして、分離株を用いてその系統位置、分類学的所属および酸素濃度に対する培養性状を明らかにするとともに、培養株は遺伝資源として保存することを目指した。

具体的には、以下のことを目的とした。

(1) 自然界で真菌が生息するさまざまな基質中の酸素濃度を実測調査し、その環境に即した培養条件を設定する。

(2) 上記 (1) で設定した条件を中心に様々な酸素濃度の条件下で基質から出現する真菌類を分離する。通常の好気培養で分離される真菌類とは異なる菌種が多く分離される条件を見出し、低酸素分離法を開発する。

(3) 分離した培養株をもとに、DNA 情報を用いてその系統位置について明らかにする。また、培養法を工夫し分離株の孢子形成を促して菌の生活史を明らかにするなど、生物としての実体を明らかにする。

(4) 分離株の培養、保存、復元条件を検討し、長期保存法を開発し、研究者に利用可能な遺伝資源として保管する。

### 3. 研究の方法

(1) 水界の微好気環境の把握と微好気分離培養法の確立

① 淡水の池 (大宮池、鳥取市上町) の底や、汽水湖 (湖山池、鳥取市湖山町) の低層部の溶存酸素濃度、水温、塩分濃度を計測して、菌類の生息環境を調査し、低酸素環境から菌を分離するための基質を採取した。

② 淡水池の底から採取した落葉 (コナラ、アラカシ、サクラ) から、前培養と本培養からなる 2 段階分離法により、低酸素、中酸素、高酸素条件下で出現した菌類を分離した。

前培養では、落葉をディスク状に切り出し、洗浄後、改変  $\text{LC}_A$  液体培地 ( $\text{LC}_A$  培地の無機塩類のみ含む) 中で振とう培養した。液体培地には 1 日 1 回、窒素・酸素・二酸化炭素の混合ガスを通気して、溶存酸素濃度が低酸素 (3.4~24.4%)、中酸素 (31.8~52.0%)、高酸素 (71.2~100.4%) となるようにして、20°C で 1 週間培養した (図 1)。これにより、異なる酸素条件に適応した菌の生育を助長し、活性化することを意図した。



図 1. 前培養の際のガス通気の方法

次の本培養では、通常の<sub>LC</sub>A寒天培地を用いて、低酸素(酸素濃度0%)、中酸素(10%)、高酸素(大気)の気相中で葉ディスクを培養して(図2)、基質から伸び出してくる菌糸や胞子を分離した。なお、低・中酸素条件で分離した菌は、アネロパック®微好気を使用して酸素濃度6-12%で培養した。



図2. 本培養の方法

③汽水湖の底部から採取した落葉などの植物基質は、洗浄後、コーンミール海水寒天培地(CMSWA;塩分濃度19‰)で、アネロパック微好気(O<sub>2</sub>=6-12%)および嫌気(O<sub>2</sub><0.1%)を使用して培養を行い、出現した菌を分離した。また、湖底のヘドロを採取して、その中に滅菌したアラカシ、コナラの落葉を基質として添加して嫌気環境下で培養する釣菌法も行い、2ヶ月間の培養後、落葉を上記と同様にCMSWAで培養して菌の分離を行った(図3)。

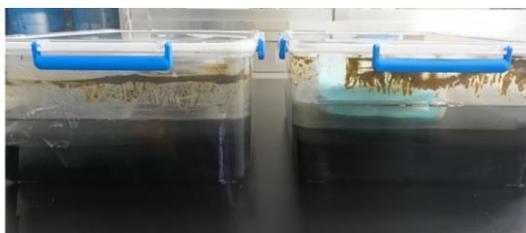


図3. ヘドロ釣菌法。密閉容器にヘドロを入れ、水面にアネロパックの酸素濃度調整剤を浮かせた。ヘドロ表面に基質となる滅菌した落葉を餌として設置して培養した。

#### (2) 分離菌の性状調査

分離株を低酸素(酸素濃度0%)、中酸素(10%)、高酸素(大気、21%)の異なる酸素濃度条件下で培養して、菌糸成長や胞子形成状況を比較した。

#### (3) 分離菌の同定

①分離株は、低・中・高の異なる酸素濃度条件下で、また、<sub>LC</sub>A, CMA, MAなどの培地を用いて培養し、胞子形成構造などの形態を観察して同定をおこなった。  
②上記①の形態情報と、rDNAのITS領域などの塩基配列からその系統位置と分類学的所属を明らかにした。

#### (4) 新規遺伝資源としての保存

分離株を保存するために、一般的な真菌培

養株の凍結保存法が適用できるかを検証したところ、問題なく適用できることが明らかになったので、申請者が所属する菌類きのこ遺伝資源センターのコレクションに寄託して、液体窒素気相中に凍結保存した。

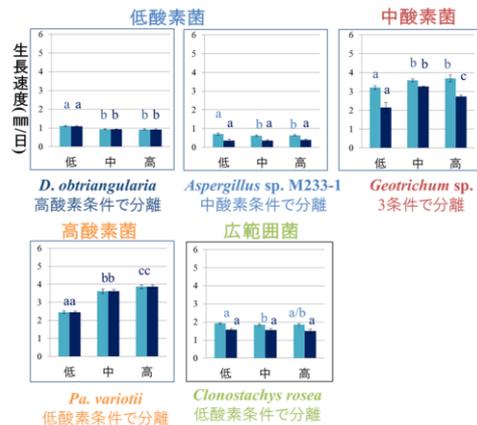
#### 4. 研究成果

##### (1) 基質採集地の環境

①大宮池(淡水池)の水底(深さ30~40cm)に堆積している落葉の下の溶存酸素濃度は、0.67mg/L(DO 8.3%)~4.18mg/L(DO 54.1%)とやや低酸素であった。水温は23.4~28.2℃。  
②湖山池(汽水湖)の水深5mの湖底の溶存酸素濃度は、0.12mg/L(DO 1.6%)~0.18mg/L(DO 2.4%)とほぼ嫌気状態で、底泥は黒色化したヘドロであった。水温は24.9~26.5℃、塩分濃度は14.5~19‰。

##### (2) 分離菌の性状と菌類相

①大宮池(淡水)の水底の落葉からの分離菌  
分離菌は *Aspergillus*, *Geotrichum* など、多くはいわゆる陸生菌であったが、水生不完全菌 *Sigmoidea* 属の1株はrDNAの配列情報から未記載種と考えられた。また、分離菌は、低・中・高の異なる酸素濃度での菌糸成長と胞子形成量から、低酸素菌、中酸素菌、高酸素菌、広範囲菌の4つのグループに類別できた(図4)。



横軸: 培養条件(酸素濃度) ※低:低酸素, 中:中酸素, 高:高酸素  
※【棒グラフ】水色:菌糸生長速度, 青色:分生子形成範囲の拡大速度

図4. 分離菌の酸素濃度に対する成長と生殖の反応で類別した4つのグループ

分離菌を4つのグループに類別すると表1のように、高酸素菌や広範囲菌が多かったが、低酸素菌(*Aspergillus* sp., *Dactylaria obtriangularia*)、中酸素菌(*Geotrichum* sp.)もわずかであったが存在した。

表1. 分離菌の類別

低酸素菌	中酸素菌	高酸素菌
<i>Aspergillus</i> sp. M233-2	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Ceriporia lacerate</i>
<i>Dactylaria obtriangularia</i> H342		<i>Chaetopsina</i> sp.
		<i>Cylindrocarpon</i> sp. H661
		<i>Discosia</i> sp. 6M263
<i>Aspergillus nigar</i>	<i>Dactylella microaquatica</i>	<i>Fusarium</i> sp. 6L0713-9
<i>Beltrania pseudorhombica</i>	<i>Monographella cucumerina</i>	<i>Paccilomyces variotii</i>
<i>Clonostachys rosea</i>		<i>Penicillium herquei</i>
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.

また、分離の際の酸素条件と分離菌株の性状との関連を見ると、高酸素菌は高酸素条件で最も多く分離されたが低酸素条件でも分離されていたり、低酸素菌が中酸素条件および高酸素条件で分離されたりと、酸素条件による選択的分離が有効でないことが分かった。これは、図4のグラフにも表れているように、高酸素菌と言っても低酸素条件でもある程度生育でき、また、低酸素菌も高酸素条件でも生育できるというように、菌類は酸素濃度に対してかなり耐性を持つためと考えられた。

## ②湖山池(汽水)の湖底の基質からの分離菌および釣菌法による分離菌

上記①で、大宮池から低酸素菌がごく少数しか分離されなかった理由として、基質を採取した環境の溶存酸素濃度があまり低くなかったことが影響している可能性が考えられること、また、淡水域だけでなく海水が流入して塩分を含む水界に生息する低酸素菌を分離することも目指して、塩分躍層によってより嫌気状態となっている湖山池の底泥部に生息する菌の分離を試みた。

表 2. 湖山池(汽水)湖底の落葉から、また、ヘドロ釣菌法で分離された菌株の異なる酸素濃度での菌糸成長速度(cm/d)と菌糸成長パターン

基質 / 分離培養条件	分離株	大気	O <sub>2</sub> 5%	O <sub>2</sub> 0%	菌糸成長パターン
湖山池落葉1 / 微好気	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.511	0.514	0.463	高中
	<i>Geotrichum</i> sp.	0.184	0.201	0.176	中
	<i>Lulwoana</i> sp.	0.435	0.265	0.292	高
	<i>Sporormiella</i> sp.	0.14	0.107	0.099	高
	<i>Penicillium</i> sp.	0.116	0.117	0.099	高中
湖山池落葉2 / 微好気	<i>Aspergillus</i> sp.1	0.266	0.25	0.189	高中
	<i>Aspergillus</i> sp.2	0.43	0.447	0.398	中
	<i>Fusarium</i> sp.	1.1	1.013	0.729	高
	<i>Fusarium</i> sp.2	0.888	0.835	0.739	高中
	<i>Absidia</i> sp.	0.607	0.522	0.461	高
	<i>Fusarium</i> sp.3	0.723	0.707	0.633	高中
	<i>Talaromyces</i> sp.	0.31	0.308	0.267	高中
	<i>Trichoderma</i> sp.	0.973	0.892	0.683	高
Eurotiaceae	0.279	0.275	0.259	広	
湖山池落葉3 / 微好気	<i>Arthrographis</i> sp.	0.302	0.278	0.281	高
ヘドロ釣菌法1 / 微好気	<i>Penicillium</i> sp.4	0.194	0.181	0.125	高中
	<i>Aureobasidium</i> sp.	0.091	0.09	0.094	広
ヘドロ釣菌法1-2 / 微好気	<i>Arthrinium</i> sp.2	1.191	1.116	0.85	高中
	<i>Lulwoana</i> sp.3	0.43	0.354	0.293	高
	<i>Zopfiella</i> sp.	0.333	0.32	0.286	高中
湖山池落葉1 / 嫌気	<i>Mucor</i> sp.	1.042	1.023	0.815	高中
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.453	0.444	0.42	高中
	<i>Geotrichum</i> sp.2	0.874	0.782	0.586	高
	<i>Lulwoana</i> sp.2	0.396	0.392	0.309	高中
湖山池落葉2 / 嫌気	<i>Fusarium</i> sp.4	1.228	1.1	0.947	高
	<i>Sarocladium</i> sp.	0.644	0.572	0.466	高
	<i>Circinella</i> sp.	1.588	1.494	1.191	高中
	<i>Paecilomyces</i> sp.	0.24	0.243	0.217	高中
	<i>Trichoderma</i> sp.2	1.172	1.016	0.719	高
ヘドロ釣菌法1 / 嫌気	<i>Mortierella</i> sp.	0.156	0.142	0.124	高中
	<i>Fusarium</i> sp.5	0.378	0.39	0.382	広
	<i>Acremonium</i> sp.3	0.619	0.608	0.605	広
ヘドロ釣菌法2 / 嫌気	<i>Mortierella</i> sp.2	0.21	0.196	0.188	高
	<i>Trichosporiella</i> sp.	0.313	0.306	0.274	高中

菌糸成長パターン 高:高酸素菌、中:中酸素菌、高中:高~中酸素菌、広:広範囲菌

その結果、分離された多くは *Aspergillus*,

*Fusarium*, *Penicillium* などの陸生の土壌菌であった。しかし、海生菌の *Lulwoana* 属菌の未記載種と考えられる菌株が複数分離された。分離株の酸素濃度に対する菌糸成長を調べると、低酸素菌と呼べるものは見いだせず、多くは高酸素菌や酸素5%の微好気でも生育が良い高~中酸素菌であった。一方で、大気~嫌気(O<sub>2</sub>=0%)でほとんど生育速度に差がない広範囲菌として、*Fusarium* sp.5, *Acremonium* sp.3, *Aureobasidium* sp. および Eurotiaceae 子嚢菌の未同定菌1株の合計4株が分離された。また、高酸素よりも中酸素(O<sub>2</sub>=5%)の方が成長が良い中酸素菌(*Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp.2)も分離された(表2)。

## (3) 分離株の保存

上記①および②で分離された菌株18株を鳥取大学農学部附属菌類さのこ遺伝資源研究センターTUFCCコレクションに登録した。また、36株を登録準備中である。菌株は、寒天平板に培養後、ストローでディスク状に打ち抜き、それを10%グリセリン凍結保護剤の入ったクライオチューブに入れて凍結し、液体窒素気相タンク(-180°C)に保存した。

## (4) まとめ

淡水域および汽水域の低酸素環境の基質から、2段階低酸素分離法や低酸素釣菌法で真菌類を分離し、それらの菌株の培養性状を調査した結果、分離株の多くは低酸素でも生育するが高酸素条件でより生育が良い、いわゆる高酸素菌(好気性菌)であった。しかし、少数ながら、低酸素で最も成長が良い低酸素菌(*Aspergillus* sp. TUFCC100977, *Dactylaria obtriangularia* TUFCC100978)が分離された。また、微好気条件(O<sub>2</sub>=5 or 10%)で最も生育が良い中酸素菌(*Geotrichum* sp. TUFCC100979, AN-2052; *Aspergillus* sp.2, AN-2067)も分離できた。さらに、嫌気~微好気~好気の各条件で、生育がほとんど変わらない広範囲菌として、*Dactylella microaquatica* TUFCC100984, 100985; *Beltrania pseudorhombica* TUFCC100986; *Aureobasidium* sp. AN-2077; *Fusarium* sp.5 AN-2081; *Sarocladium* sp. AN-2082)が分離され、これらは低酸素環境に適応して生息できる菌類と考えられた。これらの菌が実際に低酸素環境で硝酸呼吸を行って生活しているのかを明らかにするためには、硝酸呼吸にかかわる遺伝子の保有の有無、また、同位元素を用いた硝酸呼吸経路による代謝の確認が必要である。

本研究では水界に生息する水生菌類の中で、低酸素環境に適応している未知の菌類の発見を目指したが、淡水域からは *Sigmoidea* sp. TUFCC100987 および *Beverwykella pulmonaria* TUFCC100988 が高~中酸素菌として、一方、汽水域からは海生菌 *Lulwoana* spp.

AN-2050, 2055, 2079 が高または高～中酸素菌として見いだされたのみであった。しかし、これらには未記載種が含まれ、新たな低酸素分離法により、未知の菌が取得できた可能性がある。今後分類学的所属を明らかにするとともに、性状や生活史の特徴を明らかにするとともに、この低酸素分離法の有効性を検証していく必要がある。

<引用文献>

- ①Shoun, H., Tanimoto, T., Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction, *J. Biol. Chem.* 266, 1991, 11078-11082
- ②高谷直樹、祥雲弘文、低酸素環境下でのカビの呼吸と発酵、*Bioscience & Industry*, 63, 2005, 506-510
- ③Medeiros, A.O., Pascoal, C., Graça M.A.S., Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions, *Freshwater Biology*, 54, 2009, 142-149
- ④Jones, M.D.M., Forn, I., Gadelha, C., Eghan, M.J, Bass., D., Massana, R., Richards, T.A., Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life, *Nature*, 474, 2011, 200-205

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 1 件)

- ①中桐 昭、微好気培養法を用いた水生菌類の探索と系統進化の解明、*IFO Research Communications*、査読無、Vol. 29、2015、p.99.

[学会発表] (計 3 件)

- ①中桐 昭、微好気培養法を用いた水生菌類の探索と系統進化の解明、発酵研究所第9回助成研究報告会、大阪府豊中市、千里ライフサイエンスセンター、2015年6月5日
- ②足立陽子、早乙女梢、前川二太郎、中桐昭、水界の低酸素環境に生息する菌類の分離とその性状調査、日本菌学会第59回大会、那覇市、ぶんかテンプス館、2015年5月17日
- ③畑 和秀、早乙女梢、前川二太郎、中桐 昭、微好気培養法による菌類の探索と分離菌の特性調査、日本菌学会第58回大会、石川県小松市、サイエンスヒルズこまつ、2014年6月15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中桐 昭 (NAKAGIRI, Akira)  
鳥取大学・農学部附属菌類きのこ遺伝資源  
研究センター・教授

研究者番号：70198050

(3) 連携研究者

早乙女 梢 (SOTOME, Kozue)  
鳥取大学・農学部附属菌類きのこ遺伝資源  
研究センター・準教授  
研究者番号：90611806

(4) 研究協力者

足立 陽子 (ADACHI, Yoko)  
杉本 直人 (SUGIMOTO, Naoto)  
畑 秀和 (HATA, Hidekazu)