

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：62611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12643

研究課題名(和文)次世代シーケンサを用いた東南極・昭和基地周辺における菌類相の季節変動と遷移の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Changes in the fungal communities in seasonal variations using by next generation sequencer

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では日本の南極観測の拠点である東オングル島から異なる季節(12月(春)と2月(秋))にそれぞれ同じ地点から採取された土壌における菌類の多様性の変化についてillumina社製の次世代シーケンサーMiseqを利用してその解明を試みた。次世代シーケンサーで得られた配列を解析した結果、菌類では、128の集団に分類することが出来た。この集団を詳細に解析し春と秋の季節の違いによる菌類相お変化を調べたところ、季節によって菌類相が大きく変化することが世界で初めて明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the changes of fungal community in soil collected from different season at the same sampling point of East Ongul Island, East Antarctica using by next generation sequencer. As a result of next generation sequence analysis, the fungal sequence data were classified to 128 OTU. By detailed analysis of the OTU about changes of the fungal community by different seasons (Spring and Autumn), the fungal community was dramatically changed by seasons. This is a first report about changes of the fungal community by seasons in Antarctica.

研究分野：菌学

キーワード：南極 メタゲノム 次世代シーケンス 菌類 昭和基地 東オングル島

1. 研究開始当初の背景

菌類は世界中から約10万種報告されており、地球上では昆虫に次ぐ多様性に富んだ生物となっている。また、極地の環境は貧栄養であることから有機物の最終分解者である菌類は、この地域における炭素循環、特に土壤中において極めて重要な役割を果たしており、環境変動によるその多様性のわずかな変化は、極地における物質生産に多大な影響を及ぼしている (Biodivers Conserv 5: pp 1395-1431, 1996)。

南極域に生息している菌類はこれまで1000種ほどしか報告されておらず、南極の中でも特に環境が厳しい大陸性南極からは約130種の菌類が記載されているだけである。南極域には限られた国の研究者に限られた機会しか行くことができず、参加する研究者の分野も多岐に渡ることから、必ずしも毎年同じ地域でサンプリングできるとは限らない。このため、南極域に生息している菌類についての研究は新種報告や小規模な多様性解析と分離した菌類の生理学的な特徴を調べられているのに留まっており、異なる季節に採取した同じ場所における菌類相の変化を明らかにしたという研究はこれまでのところ培養法やクローン解析など従来の手法による研究を含めても無い。このようなことから近年、菌類の多様性を次世代シーケンサによって網羅的に解明しようとする挑戦が盛んに行われている。しかし、南極産菌類の報告数自体が少ないことに加え、菌類の分類には高度な専門知識が必要であることから、南極産菌類の網羅的な多様性解析は未だに行われず、南極域における環境変動と菌類相の変化の関連性は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本申請課題では昭和基地周辺に生息する菌類の多様性と同一地点における菌類相の季節変動及び経年変化を次世代シーケンサにより世界で初めて解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 第49次および第56次南極地域観測隊において、採取した昭和基地周辺の同一地点の土壌や湖底堆積物などの環境試料について、それぞれのサンプルの水分含量、pH、全炭素・窒素濃度、栄養塩濃度等の測定を行う。
 (2) 上記の試料から菌類をpHや栄養素の濃度が異なる培地により分離する。取得した菌株の種名を決定した後、各株の塩基配列情報を取得し、塩基配列のデータベースに登録をすることで、南極産菌類の報告数を増やす。
 (3) (2)で使用したのと同じ試料から菌類のDNAをビーズ破砕法により取得する。取得したDNAは環境試料中に含まれる菌類の多様性解析に最も広く利用されている26S rDNA領域を利用してDNAを増幅させる。その後、

illumina社の次世代シーケンサMiseqを使い昭和基地周辺に生息している菌類の配列データを取得する。取得した配列データはQIIMEを利用したプログラムにより解析を行う。

以上の実験により、昭和基地周辺に生息している菌類の多様性を明らかにすることができる。また、第49次および第56次南極地域観測隊において異なる季節と年に同じ地点で採取した試料における菌類の多様性データを比較することで、昭和基地周辺における菌類相の季節による変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 土壌成分分析

まずは、第49次南極地域観測隊により採取された異なる季節(春と秋)にそれぞれ同じ地点から採取された土壌における水分含有率、pH、全炭素および全窒素濃度等の測定を行なった。東オングル島における各種の数値は以下ようになった。

	水分含有率	pH	全炭素	全窒素
春	4.15%	6.38	0.04%	0.002%
秋	0.53%	6.23	0.04%	0.002%

表1. 東オングル島における土壌成分

土壌の各種成分分析の結果から、東オングル島では土壌のpH、全窒素、全炭素の数値は季節による変動は見られなかったが、水分含有率は春では約4%であったのに対し、秋には0.53%まで大幅に減少していた。

(2) 菌類の分離とデータベースへの遺伝子配列の追加登録

土壌成分分析に使用した試料と同じ試料から菌類の分離を試み、約300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る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。その結果、子のう菌類11種、担子菌類18種に分類され、この内、子のう菌類では11種中9種が、担子菌類では18種中15種が東オングル島では初めて報告される菌類であった(雑誌論文)。東オングル島から初めて分離された担子菌類15種の中で2種が新種の菌類であり、日本の南極観測史上初めて昭和基地周辺から菌類の新種報告を行なった(雑誌論文)。本研究課題で分離した300株の中で約7割が担子菌類であり、その全てが酵母状の形態を取っていた。これらの実験で得られた塩基配列情報をデータベースに追加することにより、南極産菌類の塩基配列情報の増強を行った。

(3) 次世代シーケンサーでの菌類の多様性解析

日本の南極観測の拠点である東オングル島から第49次南極地域観測隊により採取され

た異なる季節（春と秋）にそれぞれ同じ地点から採取された土壌における菌類の多様性の変化について illumina 社製の次世代シーケンサーMiseq を利用して、その解明を試みた。土壌中に含まれる菌類の DNA は Fast DNA Spin kit for Soil (MP Biomedicals) を使用し、Fast Prep(MP Biomedicals) でビーズ破砕法により抽出を行った。抽出した DNA は 26S rRNA をターゲットとしたプライマーを用い、Kapa Hifi DNA Polymerase (日本ジェネティクス社) により増幅した。増幅した DNA は Nextera XT Index Kit (illumina) を利用し、ライブラリーの作成を行った。作成したライブラリーは illumina 社の Miseq により配列の取得を行った。

その結果、菌類では 128 操作的分類群 (OTU) にクラスタリングすることが出来た。この OTU の中には、これまで東オングル島をはじめとする昭和基地周辺から報告されていないツボカビ類、コウマクノウキン類、接合菌類が含まれていた。このことから昭和基地周辺にはまだこの地域から報告されていない多くの菌類が存在する可能性が示唆された。また、春と秋の季節の違いによる菌類相を調べたところ、春では子のう菌類が占める割合が高かったが、秋では担子菌類の占める割合が高くなっていったことから、東オングル島では気温の高い春～夏にかけては子のう菌類が優占するが、気温が下がる秋以降はより低温に強い担子菌類が優占し、季節によって菌類相が変化することが世界で初めて明らかにすることが出来た。

また今回、これまで南極域では困難であった菌類の大規模な多様性解析を次世代シーケンサーを利用することで、明らかに出来たことから、今後、東オングル島以外の地点でも同様の多様性解析をすることが可能となり、未だに明らかにされていない南極域における微生物の多様性の解明に大きく貢献することが可能となった。

〔引用文献〕

- 1) Mycol Res 105: 1422-1432, 2001
- 2) Fungal Ecol 5: pp 381-394, 2012

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 6 件)

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

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

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, 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 Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion, Polar Biology, 査読有、Vol. 41, No. 2, 2018, pp. 249-258, 2018.

Tsuji M, A catalog of fungi recorded from the vicinity of Syowa Station, Mycoscience, 査読有、2018, in press.

DOI: 10.1016/j.myc.2017.08.007

〔学会発表〕(計 7 件)

Nakashima T, Takeuchi N, Uetake J, Tanabe Y, Tsuji M, Miyachi 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)

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)

辻雅晴、南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の低温ストレス反応、第 68 回日本生物工学会大会 2016, 9 (富山県、富山市)

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、日本生物工学会、2017 年 9 月 14 日、(東京、早稲田大)

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 年 12 月 5~6 日、(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 8 回極域シンポジウム、2017 年 12 月 5~6 日、(東京都、立川市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

辻本 恵 (TSUJIMOTO Megumu)
国立極地研究所・研究教育系・特任研究員

研究者番号：90634650

植竹 淳 (UETAKE Jun)
国立極地研究所・国際北極環境研究センター・特任研究員

研究者番号：40455473

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()