

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18570100
 研究課題名 (和文) 深海熱水冷湧水生態系における真菌類の多様性と未知原始菌類の探索および分離
 研究課題名 (英文) Fungal diversity in deep-sea hydrothermal and cold-seep ecosystems: investigation and isolation of novel early fungi.
 研究代表者
 長濱 統彦 (NAGAHAMA TAKAHIKO)
 独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員
 研究者番号：10359169

研究成果の概要：

深海環境における真菌類の群集構造解析 (環境抽出 DNA クローン解析) と真菌類の分離培養法により、多様性を調査した。主に相模湾メタン冷湧水に由来する化学合成生態系環境からサンプリングを行い、出現菌類を比較した。培養法により得た真菌分離株の多くは子嚢菌類に属していた。一方、出現したクローンの 3 分の 1 以上がツボカビ類に由来したが、これらは今回用いた分離培養法では単離することができず、未知の特異な代謝系を有する可能性があった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：深海環境、真菌類、初期進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 深海底における生態系の理解は、熱水・冷湧水・鯨骨などを基にしたエネルギー獲得と分配、いわゆる化学合成共生系を中心に進展している。一方でそれら生態系における分解者の活動についての調査はほとんどなされていない。真菌類はその多くが生態系中での分解者の役割を負い、構造多糖など環境中の難分解性物質の主たる分解者として知られているが、深海底における真菌類の報告は極めて限られており (Kohlmeyer and Kohlmeyer 1979)、その多様性や生態系における役割はほとんど明らかになっていない。一方で、これまでの我々の研究成果から酵母に関していえば、深海環境から分離されるも

のは陸上由来のものとは大きく異なっており、そのなかには多くの新たな系統群が含まれていることがわかってきた (Nagahama 2005; Nagahama et al. 2001a; 2001b; 2003a; 2003b; 2005)。このことは、深海環境にはこれまで未知の系統群が酵母以外の真菌類においても高い確率で存在していることを推測させる。

(2) 一方、真菌類は約 6 億年前に植物とともに陸上に上がったと推定されており (Redecker et al. 2000; Heckman et al. 2001)、それ以前に原始菌類が熱水冷湧水生態系を生活圏としていた可能性は十分に高いと思われる。約 10 万種とも言われる真菌類の推定種数のなかでも、分子系統樹上から

見て最も根元近くから分岐している下等菌類 (lower fungi, basal fungi) と呼ばれるグループは、高等菌類 (子囊菌類、担子菌類) と比較して現在までの報告数があるかに少ない (Hawksworth 1991; Hawksworth 2001)。このデータサンプリングの乏しさのために菌類の初期進化に関する我々の知見は非常に限られたものとなっている。このことはこれら菌群の栄養要求性の特殊さに加え、多くの下等菌類、特に単鞭毛を有し原始的な形態を維持しているものが、陸上と比較して探索のより困難な水環境に多く生息していることが大きな原因であると考えられる。

(3) 近年、深海および熱水環境における真核微生物の多様性もいくつか報告されてきている (Edgcomb et al. 2002; Lopez-Garcia et al. 2003; Takishita et al. 2005)。しかし、深海においてはこれまでに真菌類はマイノリティであり、通常の実核生物の rDNA などターゲットとした PCR 増幅産物に基づく解析では有孔虫やその他の原生動物、微細藻類などに隠れて感知できないことも多い。一方で、化学合成生態系において局所的に菌類クローンが優占となる場合があることも最近分かってきた。また、動物と菌類の中間的な進化的位置を占める *Ichtyosporea* や有鞭毛菌類であるツボカビ類に関連したクローンも検出されている。このことは熱水冷湧水生態系を舞台として原始菌類が大きく進化放散し、豊かで大きな未知菌類の楽園が広がっている可能性をも提示している。深海生態系は現在のところ規律ある保存・管理が行われているわけではないため、緊急に菌類を対象として、熱水冷湧水生態系を広範囲に調べる必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は深海底、特に熱水冷湧水に基づく化学合成生態系のなかでの真菌類の多様性の理解である。菌類を対象として、熱水冷湧水生態系を広範囲に調べる必要があると考えられる。第二に未知原始菌群の単離およびその生態系における役割の理解を目的とする。多様な菌類クローンが検出されたサイトを中心にサンプリングを集中的に行なうことにより、それら菌群の分離培養を試み、形態的および生理生化学的な特徴を明らかにする。これら取り組みによりこの菌群の生態的意義および役割が明らかになると考えられる。さらには菌類の初期進化に関する知見を深めることが最終的な目標である。

3. 研究の方法

(1) サンプリング 日本海溝冷湧水口 (38-40N; 143-144E)、相模湾冷湧水口 (35

00N; 139 135E)、黒島海丘冷湧水口 (24 78N; 124 11E)、を中心とした熱水冷湧水地点からのサンプル取得を試みた。これには海洋研究開発機構所有の船舶 (かいれい、よこすか、なつしま) および有人無人潜水艇 (しんかい、ハイパードルフィン) を使用し、そのペイロードに設置された底泥用滅菌サンプラーを用いた。これを用いることにより、最も菌類密度が高いと考えられる堆積物表層から、雑菌の混入を極力避けながらのサンプリングが可能であった。また、サンプリング回数が制限された場合には、過去に海洋研究開発機構により取得された凍結保存サンプルの委譲を受ける、もしくは当機構の乗船研究員にサンプル分譲を依頼した。さらに過去に当機構研究員により抽出された DNA を用いることを試みたが、ほとんどが MOBIO 社のキットを用いて DNA 抽出が行われていたため、使用を断念した (理由は後述)。

(2) サンプルは凍結保存および無水エタノールにて保存、当機構に持ち帰った後、当初は MOBIO Soil DNA Extraction Kit (MOBIO) により DNA の抽出を行なった。しかし、その後 MOBIO キットに *Acremonium* 菌類の混入が見られることがわかったため、Isoil DNA Extraction Kit (ニッポンジーン) へと変更し、MOBIO 社のキットを用いて得たデータは破棄した。抽出 DNA は、rDNA をターゲット遺伝子として、真菌類特異的増幅用、真核生物増幅用、コントロールとしての細菌増幅用の 3 組、を用いて、SPEEDSTAR-HS Polymerase (TaKaRa) により PCR 増幅を試みた。既知の多くの菌類特異的 PCR プライマーを試したが、ほとんどは増幅効率が悪い、特異性が低く、深海サンプルには適さなかった。最終的に以下のプライマーを用いて増幅を行った (図 1)。

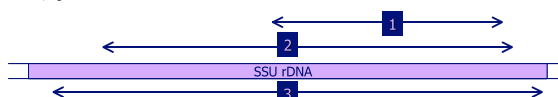


図 1 用いられた PCR プライマー (SSU rDNA 領域)

- 1
nu-SSU-0817 (TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA)
nu-SSU-1536-39 (ATTGCAATGCYCTATCCCCA)
(Borneman and Hartin 2000)
- 2
AU2 (TTTCGATGGTAGGATAGDGG)
AU4 (RTCTCACTAAGCCATTC)
(Vandenkoornhuysen et al 2002)
- 3
SSU82F (GAAACTGCGAATGGCTC)
SSU1498R (CACCTACGGAAACCTTGTTA)

1 と 2 は菌類特異的プライマーであり、1 は増幅長が約 750bp と短いものの増幅効率が良かった。2 は多くの研究で用いられているプ

ライマーで、約 1400bp を増幅可能だが効率に劣ったため、初めに 3 の真核生物特異的プライマーで増幅し、その PCR 産物を 2 のプライマーペアで増幅する、Nested PCR を行った。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ンについて、ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (PE Biosystems)、または MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Bioscience) 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理された後、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。整理配列には Clustalw/x を、系統樹推定には PAUP4.0*, Modeltest, MrBayes, MrModeltest 等を用いた。以上手順により、各熱水湧水サイト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。

(3) 培養分離には、以下の栄養平板培地とそれらを 10 倍希釈したものをを用いた。YM agar, Potato-Dextrose agar, Nutrient agar, PYGS agar, Marine agar (DIFCO)。培地は人工海水で溶解し、抗生物質を添加した。4°C にて 3 ヶ月間の培養を行い、出現したコロニーを同じに培地に 2, 3 回継代し、単一株とし、10% グリセロール保存液中にて凍結保存を行った。

4. 研究成果

取得したサンプルのうち、沈降鯨遺体サンプル、日本海溝サンプル、鹿児島湾サンプルについては、MOBIO 社のキットを用いて得た結果であるため割愛した。相模湾メタン湧水における結果を報告する。

(1) 培養法による結果

各培養条件から 134 株を分離し、その LSU rDNA 遺伝子および ITS 配列を指標として同定した。Zygomycota (接合菌類) 3 株, Basidiomycota (担子菌、全て酵母) 5 株を除く 126 株全てが Ascomycota (子囊菌類) であった。LSU rDNA の 99% 以上の同一性を同一種とみなした場合、81 種が認められ、高い多様性を持つことが示された。そのうち 25 種 35 株が既知 LSU rDNA 配列に対して 2% 以上の差異を持っており、新種であることが期待される。頻出種 (分離数) は

Pseudeurotium zonatum (10)、
Curreya pityophila (7)、
Candida pseudolambica (5)、
Williopsis saturnus (5)、
Pyrenochaeta nobilis (5)

であったが、*P. nobilis* を除いて既知 LSU 配列と 99% 以上の同一性を持っていた。

決定した配列のうち、LSU 配列を元に系統関係の推定を行った。ほとんどが子囊菌類であったため、それを綱レベルの 5 分類群に振り分け、担子菌類と接合菌類をひとつにまとめて、6 つの分類群についてベイズ法による系統推定を行った。

結果、全分離株のうち、子囊菌酵母は約 13% を占めた (図 2)。高次分類群としては、フンタマカビ綱 Sordariomycetes に属する分離株が約 43% を占め最も多く、うち約 4 割がボタタケ目 Hypocreales であった。

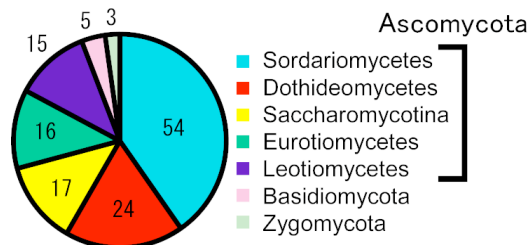


図 2 分離株の高次分類群ごとの割合 [LSU rDNA と ITS regions の blastn と系統解析に基づく分子同定結果]

全体的に見て、これまでに海洋環境から報告のある菌類種や代表的な海生菌と近縁なものも一部含まれていたが、多くの分離株は寄生的共生的な生活様式を持つ菌類に近い位置を占めた。これらは化学合成生態系を構成するハオリムシや二枚貝などの無脊椎動物に由来する可能性がある。植物への病原性が報告されているものの近縁種も分離されたが、それが単に底泥微生物であるのか、陸からの流出由来であるのか、別の生態を有しているかは明確ではない。また熱水環境の無脊椎動物に対して菌類の病原性が報告されているが (Dover et al. 2007)、それに近縁な菌類種も分離された。環境抽出 DNA に基づく深海菌類相の既報 (Bass et al. 2007, Lai et al. 2007) では多くが酵母様クローンにより占められたが、本研究では糸状子囊菌が優占した。この理由としては比較的陸に近く内湾部のため、陸から影響が大きいことが挙げられる。また一部は好冷性および耐冷性菌との類縁を示した。接合菌類 *Mucor* sp. に位置するもののひとつは 8°C 以上で生育しない高度好冷菌であった。

(2) 底泥抽出 DNA による結果

2004 年と 2008 年の底泥サンプルより抽出した核酸から、2 種類のプライマーを用いて 18S rDNA の PCR 増幅を行った。ひとつは約 800 塩基、もうひとつは約 1400 塩基を増幅可能であった。まず 800 塩基のクローンについて、年次別にそれぞれ 64 クローン、計 128 クローンを取得し、塩基配列の決定を行った。高次分類学的位置を blastn 検索と系統解析により調べた (図 3)。

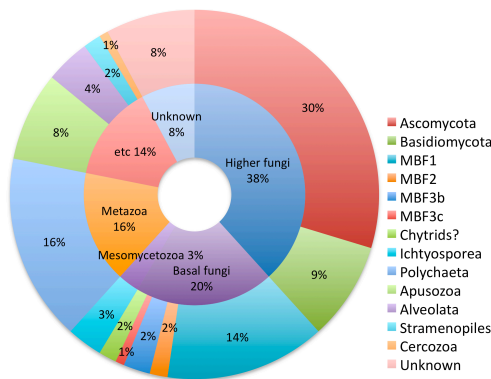


図 3 相模湾底泥抽出 DNA からみた、SSU rDNA 配列に基づく菌類多様性

2004 年と 2008 年からの結果を合わせてみた結果、約 6 割が菌類由来クローンであった。うち、約 2/3 が高等菌類で、残りが下等菌類であった。高等菌類のうち、3/4 が子囊菌類であった。下等菌類もしくは原生生物と見られるクローンについては、既知生物の配列との相同性が非常に低いものが多かった。そのため、下等菌類についてはその系統関係に基づいてグループ分けし、それを MBF1, MBF2, MBF3 (Marine Basal Fungi) とした。特に MBF1 はかなり高い割合を占めた。次に 2004 年と 2008 年の結果を比較した (図 4)。

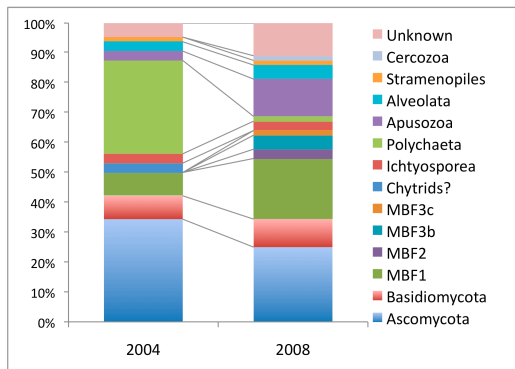


図 4 2004 年と 2008 年の底泥抽出 DNA による菌類相の違い

全体的には大きな相違がなく、相模湾菌類の構成は比較的安定していた。Polychaeta (多毛綱、ゴカイ等) の配列数に大きな違いがあ

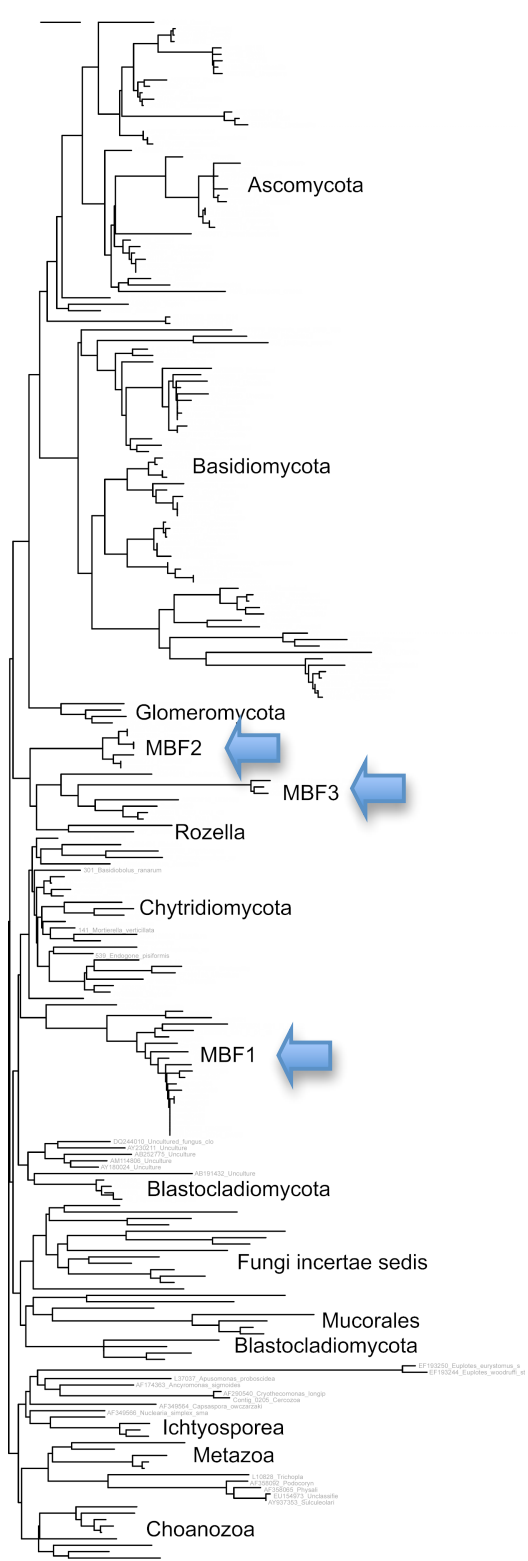


図 5 相模湾底泥から出現した菌類の初期進化系統群 MBF1, MBF2, MBF3 の系統学的位置

ったが、多細胞生物である故であると思われる。MBF1, MBF2, MBF3 の系統については既知生物との相同性が低く、その分子系統学的帰属

明らかにするのは困難であると思われたため、もうひとつの約 1400 塩基を増幅するプライマーセットにより得られたクローンをを用いて、その系統学的位置を明らかにすることを試みた (図 5)。しかしながら、菌類の初期進化の明確な系統関係は現在も明らかになっておらず、SSU rDNA 配列のみでは信頼度の高い系統関係を推定することは難しい。MBF1 に関して、菌類進化の初期において分散していることは明らかだが、どの系統群と関連があるのかを明確にすることはできなかった。しかしながら、MBF2、MBF3 は *Rozella* spp. と比較的近い系統関係を有することが示唆された。これらは LKM11 clade として既に報告されているグループに含まれる。これらは嫌気的環境から普遍的に出現することが知られており、新たな代謝系を有する興味深い生物群であるが未だ培養例がない。これまでの報告 (Bass et al. 2007, Lai et al. 2007) と比較して、下等菌類 (Basal fungi、図 3、図 4) の割合が非常に高く、そのなかから現れた 3 つの主な系統群 MBF1、MBF2、MBF3 のそれぞれがそのなかで多様性を有していた。またその系統学的位置や分類学的帰属は明確ではないものの、菌類起源に関連する系統である可能性もある。また深海メタン冷湧水生態系からこのような複数系統が大量に現れたことは、深海において菌類の初期進化分散が起こったか、もしくは海洋環境において起きたそれが深海に保存されていたものと解釈することも可能である。さらに MBF2 および MBF3 は *Rozella* spp. と系統的な類縁を示していた。*Rozella* sp. は菌類の最も起源的な系統であるとの仮説が最近報告されており (James et al. 2006)、深海から出現した系統がこれとの類縁を示したことは菌類初期進化の深海起源の証拠になりうるかも知れない。図 1 と図 3 を比較すると、メタン冷湧水環境に存在する真菌のうち実際に分離可能なのは、ほぼ子嚢菌類だけであることがわかる。担子菌類に関しては、*Rhodotorula* に代表される赤色酵母や *Cryptococcus* などの低温性酵母はしばしば分離法により得られるが、抽出 DNA から見た場合、酵母以外の多様な担子菌類がこの環境に存在していることが明らかになった。特に *Malassezia restricta* に近縁な菌類クローンが複数検出されているが、これは他の深海における環境微生物研究においても同様に見いだされており、深海もしくは海洋環境において普遍的に存在することが予想される。しかしこれまでこの真菌は海洋底泥からの報告がない。元来 *Malassezia* spp. は動物の皮膚常在菌および病原菌として知られており、海洋動物に由来している可能性もあるが、ほとんど海洋動物の見られないような環境からもしばしば大

量に検出されており、皮膚常在以外のこれまでに知られていない生態を持っている可能性もある。下等菌類 (MBF1, MBF2, MBF3) に関しては、元々分離法によって得られない菌種が多いが、抽出遺伝子クローンの割合とその多様性から見て相当量の菌体が深海底泥中に存在していると思われる。その深海と多様性、生態を明らかにすることは、海洋微生物の生態系を理解するために、さらには菌類の初期進化、ひいては opisthokonts (動物と菌類の共通起源グループ) の起源を知るためにも重要であるだろう。

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)

- ① Mohamed A. Abdel-Wahab, Takahiko Nagahama, Faten A. Abdel-Aziz, Two new *Corollospora* species and one new anamorph based on morphological and molecular data, *Mycoscience*, 50, 147-155, 2009, 査読有
- ② Takahiko Nagahama, Mohamed A. Abdel-Wahab, Yuichi Nogi, Masayuki Miyazaki, Katsuyuki Uematsu, Makiko Hamamoto, Koki Horikoshi, *Dipodascus tetrasporus* sp. nov., an ascosporegenous yeast isolated from deep-sea sediments in the Japan Trench, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 58, 1040-1046, 2008, 査読有
- ③ Masayuki Miyazaki, Yuichi Nogi, Yoshihiro Fujiwara, Masaru Kawato, Takahiko Nagahama, Kaoru Kubokawa and Koki Horikoshi, *Amphritea japonica* sp. nov. and *Amphritea balenae* sp. nov., isolated from the sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 58, 2815-2820, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 高橋恵理子, 深海冷湧水域における好冷性真菌の分離と多様性, 日本農芸化学学会大会, 平成 21 年 3 月 28 日, マリンメッセ福岡
- ② 長濱統彦, 相模湾冷湧水生態系の菌類多様性, 日本菌学会第 52 回大会, 平成 20 年 5 月 31 日, 三重大学
- ③ Mohamed A. Abdel-Wahab, Lignicolous marine fungi from Yokosuka, Japan, 日本菌学会第 52 回大会, 平成 20 年 5 月 31 日, 三重大学

- ④ Takahiko Nagahama, Fungal diversity in the whale-fall community at deep-sea floor, the Xth International Marine and Freshwater Mycology Symposium, 2007年12月10日, Hotel Park-Royal, Penang, Malaysia
- ⑤ Mohamed A. Abdel-Wahab, Taxonomy of the genus *Corollospora* with the description of three new species and one anamorph based on morphological and molecular data, the Xth International Marine and Freshwater Mycology Symposium, 2007年12月10日, Hotel Park-Royal, Penang, Malaysia
- ⑥ 長濱統彦, 鯨骨生物群集域の真菌多様性と分離, 第3回進化原生生物研究会, 2007年7月7日, (独)海洋研究開発機構・横浜研究所

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長濱 統彦 (NAGAHAMA TAKAHIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境
生物圏研究センター・研究員

研究者番号: 10359169

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし