

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19570100

研究課題名（和文） 低温性担子菌類の環境適応と種内分化に関する研究

研究課題名（英文） Environmental adaptation and intraspecific differentiation of cold-adapted basidiomycetous fungi

研究代表者

星野 保 (HOSHINO TAMOTSU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60357944

研究成果の概要（和文）：

雪腐病菌は好冷性あるいは耐冷性の牧草，冬作物および針葉樹実生に対して積雪下，病原性を示す菌類の総称である。本研究では雪腐病菌の種多様性，生理的および生化学的性質の解明を行った。その結果，低温耐性は，雪腐病菌の地理分布に関して重要な因子であることを明らかにした。これは雪腐病菌が積雪下，菌糸伸長を行うためであり，この結果，低温下で活性を示す酵素を生産する。担子菌に属する雪腐病菌は，細胞外に不凍タンパク質を分泌し，これにより細胞外の環境を生育に適した未凍結状態を維持するものと考えた。子嚢菌に属する雪腐病菌 *Sclerotinia borealis* は，凍結状態での増殖が未凍結状態に比較して早く，このため不凍タンパク質の生産は認められなかった。この性質は本菌の有する浸透圧耐性によることを明らかにした。これらの結果から，雪腐病菌は分類群毎に異なる環境適応戦略を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Snow molds are psychrophilic or psychrotrophic fungal pathogens of forage crops, winter cereals, and conifer seedlings. These fungi can grow and attack dormant plants at low temperatures under snow cover. In this study, we surveyed the biodiversity and physiological and biochemical characteristics of snow molds that belong to various taxa. Cold tolerance is one of the important factors related to their geographic distribution, because snow molds develop mycelia under snow cover and because they should produce intra- and extracellular enzymes active at low temperatures for growth and infection. Basidiomycetous snow molds produce extracellular antifreeze proteins. Their physiological significance is to keep the extracellular environment unfrozen. The psychrophilic ascomycete *Sclerotia borealis* shows normal mycelial growth under frozen conditions, which is faster than that on unfrozen media at optimal growth temperature. This fungus does not produce extracellular antifreeze proteins, but osmotic stress tolerance enables the fungus to grow at subzero temperatures. In conclusion, different taxa of snow molds have different strategies to adapt under snow cover.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物多様性・分類

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：菌類，遺伝的多様性，環境適応，凍結耐性，種内分化，雪腐病菌，北米

### 1. 研究開始当初の背景

雪腐病菌は，積雪環境下で越冬性作物に対して病原性を示す糸状菌の総称である．これら雪腐病菌は，積雪環境への適応性の差から好冷菌（20℃以上では増殖不可能）と耐冷菌（20℃以上でも増殖可能）に大別される．本研究の主な研究対象である低温性担子菌 *イシカリガマホタケ* (*Typhula ishikariensis*) は植物病原菌であるため病徴を生じ，さらに菌核とよばれる直径数 mm の「キノコの種」を形成することから，採集地での個体識別が可能である．また，担子孢子が短命であるため風媒等によって分散することが無く，主に菌糸の栄養増殖によって，その分布を拡大しているとされる．このため一般の微生物とは異なり，遺伝的多型が多く存在し，生息地に適応した亜種を生じ易いとされる．

本菌は，形態および交配型から生物種 I および生物種 II と呼ばれる亜種に大別され，本菌の交配型は研究室で簡単に再現できる．本菌は日本・旧ソ連圏・スカンジナビア諸国・北米など北半球に広く分布するとされ，研究代表者らは，これまでに雪腐病菌の未報告地域であるシベリアやほとんど農業の行われていない北極圏での雪腐病菌分布調査を行い，多くの調査地で本菌を含む雪腐病菌の存在を確認した．日本・北欧（ノルウェー・アイスランド）・北米では生物種 I および II 双方の分布が確認されているが，ユーラシア全体で見ると生物種 II の分布は不連続であり，日本・サハリン・カムチャッカでは，生物種 II を容易に採取できるが，シベリア東部ブリヤート共和国（バイカル湖東部）以西では生物種 I のみしか採取できなかった．再び生物種 II が採取されるのは，ノルウェー山岳地域である．

研究代表者らは先に示したユーラシアの菌株について形態交配型に加え DNA 配列（ITS 領域を使用）の比較によって，北極圏では新たな亜種（便宜的に生物種 III と仮称）の存在を明らかにした．生物種 III は北極圏で高頻度に分離され，これは他の亜種に比較して高い凍結耐性を有することによる．

*イシカリガマホタケ* では交配型の異なる 3 種の亜種（生物種 I，II および III）が同一種内に存在し，担子孢子の形態や宿主特異性を考慮すると生物種 I から生物種 II，III への種内分化が現在進行していると推定される．また，現在の本菌の分布域の大部分は最終氷河期に氷床に覆われていたことを考慮すると，本菌は最終氷河期以降に急速に分布を拡大したものと解釈できる．生物種 I から生物

種 II，III への種内分化が，いつ・どこで生じたのか？ どの様な隔離機構によるものか？ 全く判っていない．これまでの調査結果から，ユーラシア大陸で 3 種の亜種が共存する地域はロシア極東（カムチャッカ）のみである．しかし，カムチャッカ生物種 III の生理的性質は，生物種 III の基準種となるノルウェー北部の菌株とは大きく異なっていた

### 2. 研究の目的

雪腐病菌未見地域において菌類調査を行ない，この研究結果を含む北半球全域の菌核形成能を有する雪腐病菌分布マップの作成と菌株カルチャーコレクション確立する．さらに作成したカルチャーコレクションの環境適応能の解析を進め，どのような環境要因が種内分化の引金となったのか明らかにする．また，菌株の既知遺伝子マーカーおよび環境適応に関与する遺伝子をマーカーとする分子系統解析を行い，雪腐病菌の北半球での拡散および種内分化機構に関する議論する．

### 3. 研究の方法

(1) 低温性担子菌の収集：雪腐病菌採取のための野外調査は，融雪直後に行なうことが効果的である．雪腐病菌未見の地域にて標本採集および菌株分離を行なう．採集した菌株は生育至適温度などの基本的な性質および交配用菌株との交配試験によって遺伝型の決定を行なう．また菌株が極めて特殊な遺伝型と推定される場合，人工条件下において子実体形成を行ない，本菌分類の指標となる形態形質（子実体・担子孢子）の観察や担子孢子より調整した一核菌糸を用いた遺伝型の詳細解析をおこなう．

(2) 低温性担子菌の環境適応能：採集した菌株について生息地での適応に重要と考えられる要素（凍結／融解に対する耐性，不凍タンパク質生産能，凍結培地上での増殖能など）について検討を行ない，国内外の同一遺伝型に属する菌株あるいは別の分類群に属する雪腐病菌との比較から環境適応能を評価する．この結果を踏まえて種内分化の要因となる環境要素（あるいは生理的性質）を明らかにすることを目指す．また，不凍タンパク質など分子レベルの環境適応に関与する生体分子の探索を行なう．

(3) 低温性担子菌の遺伝子解析：研究室保存株および新たに採取した菌株より全 DNA を抽出し，既存の分類マーカーとして知られて

いるゲノムrDNA上のITS領域およびミトコンドリア遺伝子の配列比較を行ない、本菌の遺伝的多様性を概観する。

#### 4. 研究成果

ユーラシア各地にて採集した菌株は交配試験の結果3グループに分かれ、さらに核ゲノムおよびミトコンドリアゲノム由来マーカー遺伝子を用いた解析でも同様の結果を得た。採集地情報を考慮するとこれら3グループは、それぞれを亜種レベルで記載可能と判断した。このため基準標本の形態・遺伝子解析を行い、北半球に広く分布する group I は *T. ishikariensis* と同じであり、group II は *T. idahoensis* および *T. ishikariensis* var. *canadensis* と同じであった。北極圏を中心に分布する group III は、これらの標本と異なり、現在廃棄名である *T. hyperborea* の記載に形態的特徴が合致した。

北半球各地にて採集した菌株について生息地での適応に重要と考えられる要素について検討を行なった。多様な生育ステージでの凍結耐性の比較の結果、子実体形成期に凍結耐性を著しく低下し、これを補償するために不凍タンパク質を蓄積することを見出した。この結果から、不凍タンパク質が環境適応能に密接に関連すると判断した。本菌では凍結によって菌糸成長が抑制されるため不凍タンパク質を細胞外に分泌することを報告し、他の雪腐病担子菌においても同様であった。一方、他の分類群では凍結耐性が異なり *Pythium iwayamai* など卵菌類では、凍結によって菌糸は容易に死滅すること、卵孢子・遊走子嚢など耐久性細胞の凍結耐性が高いこと、またこれら耐久細胞の凍結耐性は種レベルで大きく異なり、寒冷地適応した種が高い凍結耐性を示すことを明らかにした。また、*Sclerotinia borealis* に代表される子嚢菌類では上記2分類群とは大きく異なり、凍結環境下では菌糸成長が促進された。この現象は本菌の持つ浸透圧耐性と密接に関連しており、凍結環境下に存在する水分活性の低い未凍結水およびこれに含まれる栄養素を利用可能なためと推定した。これらの結果より、雪腐病菌の有する環境適応能は分類群毎に異なることを初めて明らかにした。さらに極地より採集した雪腐病菌以外の低温適応菌類に研究対象を広げた際、南極産ツボカビ類・卵菌類・子嚢菌より新たに不凍活性を見出し、不凍タンパク質が菌類に広く分布することを明らかにした。さらに子嚢菌より精製した不凍タンパク質は、担子菌類のものとは生化学的・免疫学的性質が異なり、収斂進化の結果獲得したものと推定した。

#### 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)

①N. Xiao, S. Inaba, M. Tojo, Y. Degawa, S. Fujiu, Y. Hanada, S. Kudoh, T. Hoshino: Antifreeze activities of various fungi and Stramenopila isolated from Antarctica. North American Fungi, 査読有, 5 巻, 2010 年, 215-220 頁.

②N. Xiao, K. Suzuki, Y. Nishimiya, H. Kondo, A. Miura, S. Tsuda, T. Hoshino: Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. FEBS Journal, 査読有, 277 巻, 2010 年, 394-403 頁.

③N. Matsumoto, T. Hoshino, G. Yamada, A. Kawakami, Y. Hoshino-Takada: Sclerotia of *Typhula ishikariensis* biotype B (Typhulaceae) from archaeological sites (4,000 to 400 BP) in Hokkaido, northern Japan. American Journal of Botany, 査読有, 97 巻, 2010 年, 1-5 頁.

④T. Hoshino, F. Terami, O.B. Tkachenko, M. Tojo & N. Matsumoto: Mycelial growth of the snow mold fungus, *Sclerotinia borealis* improved at low water potentials: an adaptation to frozen environment. Mycoscience, 査読有, 51 巻, 2010 年, 98-103 頁.

⑤星野 保, 糟谷大河, 竹橋誠司, 内田晁友: 道東で新たに採集されたスナハマガマノホタケ(担子菌類)の菌核. 知床博物館研究報告, 査読無, 31 巻, 2010 年, 1-4 頁.

⑥T. Hoshino, N. Xiao, O.B. Tkachenko: Cold adaptation in phytopathogenic fungi causing snow mold. Mycoscience, 査読有, 50 巻, 2009 年, 26-38 頁.

⑦T. Hoshino, S. Takehashi, M. Fujiwara, T. Kasuya: *Typhula maritima*, a new species of *Typhula* collected from coastal dunes in Hokkaido, northern Japan. Mycoscience, 査読有, 50 巻, 2009 年, 430-437 頁.

⑧T. Hoshino, M.R. Asef, I. Yumoto, R. Zare: Snow molds in the Middle East: *Typhula* species in Iran. Proceedings of the 9<sup>th</sup> Edition Tunisia-Japan Symposium on Society, Sciences and Technology (TJASSST) 2008: El Kantaoui Forum, 査読無, 2009 年, 5-9 頁.

⑨T. Hoshino, A.M. Tronsmo, I. Yumoto: Snow mold fungus, *Typhula ishikariensis* group III from Arctic Norway can grow at a sub-lethal temperature after freezing stress and during flooding. Sommerfeltia, 査読有, 31 巻, 2008 年, 125-131 頁.

⑩星野 保, 藤原峰子, 湯本 勲: 文献・標本

に基づくサハリン南部・千島諸島における雪腐病菌の記録. 日本菌類学会報, 査読有, 49巻, 2008年, 52-58頁.

⑩T. Hoshino, M.R. Asef, M. Fujiwara, I. Yumoto, R. Zare: One of the southern limits of geographical distribution of sclerotium forming snow mold fungi: First records of *Typhula* species from Iran. Rostaniha (Botanical Journal of Iran), 査読有, 8巻, 2007年, 35-45頁.

[学会発表] (計 19件)

①T. Hoshino (7人中筆頭): Cold-adapted fungi are new biological resources in lower latitude countries: Case studies in Iran and Tunisia, 第一回アルジェリア・日本学術セミナー, 2010年11月8日, Alger (Algeria).

②星野保 (4人中筆頭): 菌核形成性雪腐病菌の発生と気候変動: スバルバールと北海道を例にして, 日本菌学会第54回大会, 2010年5月28日, 東京.

③T. Hoshino (4人中筆頭): Snow molds in the Arctic and their occurrence under climate change in Svalbard and Hokkaido, northern Japan. Japan-Norway Joint Workshop, Tromsø, 11-12 March 2010 Theme: Arctic Climate and Environmental Change in Global Warming-Collaboration on Observations and Analyses, 2010年3月12日, Tromsø (Norway).

④T. Hoshino (7人中筆頭): Cold-adapted fungi. 5th International Conference on Plant and Microbe Adaptation to the Cold, 2009年12月8日, Ås (Norway).

⑤星野保 (7人中5番目): 好冷性担子菌イシカリガマホタケ由来不凍タンパク質のアイソフォームの不凍活性の解析, 第10回極限環境微生物学会年会, 2009年10月29日, 東京.

⑥星野保 (6人中4番目): 菌類・珪藻類由来不凍タンパク質の発現系構築と氷結晶結合機能の解析, 第10回極限環境微生物学会年会, 2009年10月29日, 東京.

⑦T. Hoshino (4人中筆頭): The basidiomycetous yeast, *Leucosporidium antarcticum* formed frost-pillar-like colony on frozen environments. Xth SCAR International Biology Symposium. 2009年7月28日, 札幌.

⑧T. Hoshino (5人中筆頭): Mycelial growth of snow molds under frozen condition. CRYO 2009 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 2009年7月21日, 札幌.

⑨星野保 (5人中筆頭): 凍結環境にて旺盛な増殖を示す南極産担子菌酵母の環境適応機構, 日本菌学会第53回大会, 2009年5月23

日, 鳥取.

⑩星野保 (3人中2番目): 凍結培地において霜柱状のコロニーを形成する担子菌酵母, 平成20年度極域気水圏・生物圏合同シンポジウム, 2008年12月4日, 東京.

⑪星野保 (9人中筆頭): 東南極宗谷海岸露岩地域陸上生態系における菌類の多様性と環境適応, 平成20年度極域気水圏・生物圏合同シンポジウム, 2008年12月4日, 東京.

⑫T. Hoshino (4人中筆頭): Snow molds in the Middle East, Kantaoui forum, 9th Ed. TJJASST 2008, 2008年11月9日, Sousse (Tunisia).

⑬T. Hoshino (8人中筆頭): Ecological strategies of snow molds against freezing stress, China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, 2008年7月31日, 長春 (中国).

⑭T. Hoshino (5人中4番目): Discovery of novel antifreeze proteins from Antarctic Ascomycetes, China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, 2008年7月29日, 長春 (中国).

⑮星野保: 石狩浜でみつけた新種のきのこ・スナハマガマノホタケの生き方, 第61回石狩ゼミ, 2008年4月9日, 石狩.

⑯星野保: 雪の下の小さな魔物-雪腐病菌(ゆきぐされびょうきん)の適応戦略, 雪氷談話会, 2007年12月14日, 北見.

⑰星野保 (6人中2番目): 東南極スカルプスネス湖沼群に生息する糸状菌の多様性, 第30回極域生物シンポジウム, 2007年11月15日, 東京.

⑱T. Hoshino (6人中筆頭): Some cold-adapted fungi grow on a frozen condition. International Conference Cryogenic Resources of Polar Regions, 2007年6月17日, Salekhard (Russia).

⑲T. Hoshino (3人中2番目): Opportunistic pathogens-casuses of sclerotial snow molds in Russia, Biological Diversity. Plant introduction, 2007年6月5日, St. Petersburg (Russia).

[図書] (計 3件)

①N. Matsumoto, T. Hoshino: Fungi in snow environments: Psychrophilic moulds - A group of pathogens affecting plants under snow. Fungi from different environments. Volume 1 of the series: Progress in mycological research. Science Publisher, 2009年, 167-186頁.

②T. Hoshino, O.B. Tkachenko, M. Tojo, I. Saito, I. Yumoto: Some cold-adapted fungi grow on a frozen condition. Proceedings vol. 1, Cryogenic Resources of Polar Regions. Scientific Council on Earth Cryology, RAS, Moscow, 2007年, 332-334

頁.

③O.B. Tkachenko, T. Hoshino, I. Saito: Opportunistic pathogens - causes of sclerotial snow molds in Russia. Biological Diversity. Plant Introduction (Materials of the Third International Scientific Conference, June 5-8 2007, St. Petersburg). Botanical Garden of the V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Science, 2007年, 377-378頁.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

①名称: 南極産子囊菌類の生産する不凍タンパク質

発明者: 津田栄, 星野保, 肖楠, 工藤栄

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所, 大学共同利用期間法人情報・システム研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2009-89269

出願年月日: 平成 21 年 4 月 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-grea/index.html>

アウトリーチ活動:

- ① 星野保: 雪の下の小さなきのこその生き方. 2011年5月7日. 環境・自然を考える会.
- ② 星野保: 石狩砂丘で見つかったスナハマガマノホタケとその生態. 特別展示石狩砂丘のきのこ, 2010年11月3日小樽市総合博物館.
- ③ 星野保: 石狩から南極まで. 寒さに生きる菌達を探して, 生き方をしらべる. 特別展示石狩砂丘のきのこ, 2010年9月20日石狩市石狩浜海浜植物保護センター.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 保 (HOSHINO TAMOTSU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号: 60357944

### (2) 研究分担者

吉宗 一晃 (YOSHIMUNE KAZUAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号: 50325700

湯本 勲 (YUMOTO ISAO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロ

セス研究分門・副研究部門長  
研究者番号: 30358303

(3) 連携研究者  
なし