

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440202

研究課題名(和文) 普遍的湖沼にはどんな原生生物がいるのか

研究課題名(英文) Protistan microflora and microfauna in usual lakes and ponds

研究代表者

中山 剛 (NAKAYAMA, Takeshi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40302369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：筑波大学構内の池および霞ヶ浦に生育する原生生物相を、光学顕微鏡および分子形質を基に明らかにした。その結果、両湖沼において、600種以上の原生生物が確認された。その中には、本邦でこれまで正式な報告がないものや、新規分類群も含まれた。これにより、本邦の一般的な湖沼で一般的な原生生物相(特に微細藻類相)を種レベルで明らかにすることができた。プランクトン性原生生物の生産者としては珪藻類、緑藻類、クリプト藻、ユーグレナ藻が、低次捕食者としては黄金色藻、ピコソエカ類、ユーグレナ類、キネトプラスト類、繊毛虫、アブソゾア類(広義)が普遍的であった。

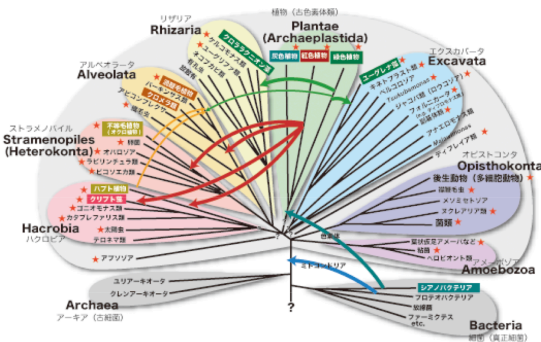
研究成果の概要(英文)：The microflora and microfauna of ponds in University of Tsukuba and Kasumigaura lake were clarified using light microscopy and molecular data. As a result, over 600 species of protists were confirmed in both stations. These protists include species that have not been reported in Japan and new taxa. This study makes possible to clarify the common protists (especially microalgae) in usual lakes and ponds in Japan at the species level. Common planktonic producers were diatoms, green algae, cryptophytes, euglenids, and common primary consumers were chrysophytes, bicosoides, kinetoplasts, ciliates, and Apsosoa (s.l.).

研究分野：系統分類学

キーワード：原生生物 微細藻 ファウナ フロラ 分類

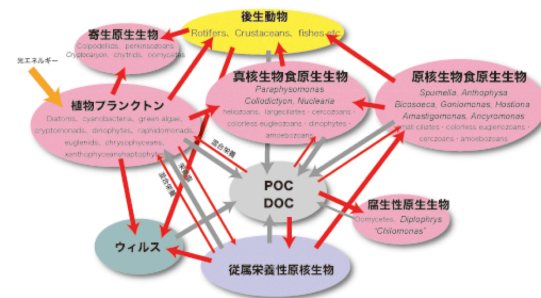
1. 研究開始当初の背景

近年、分子生物学的手法等の発展に伴い、いわゆる原生生物の多様性についての認識が急速に高まっている。真核生物は複数のスーパーグループ（オピストコンタ、アメーボゾア、エクスカバータ、古色素体類、リザリア、ストラメノパイル、アルベオラータ）によって構成されており、その系統的多様性の大部分は原生生物によって占められていることが明らかとなっている。また上記スーパーグループのどれにも属さない原生生物もいくつか知られている。このように真核生物全体の進化・多様性を探るために、原生生物多様性に対する理解が必須である（下図）。



生物の系統樹（赤星は普遍的淡水環境で確認される系統群）

またこのような系統進化的重要性とともに、原生生物が特に水圏生態系においては主役を演じていることも明らかとなっている。海でも淡水域でも基礎生産者は真核藻類（およびシアノバクテリア）であり、その消費者（捕食者、寄生者）も原生生物が重要な地位を占めている。また、生産者が食べられることなく有機物となりそれを原核生物が分解、その原核生物を原生生物が捕食するといういわゆるマイクロバイアル・ループを通じた物質・エネルギーの流れが極めて多いことも明らかとなりつつある（下図）。



水圏生態系における原生生物（ピンク色）（霞ヶ浦での調査から）

しかしこのような生態学的重要性にもかかわらず、実際に環境中においてどのような原生生物が存在するのか、といった基礎的情報が極めて不十分である。近年では環境DNAを用いてこのような生態系における原生生物の多様性を探究する試みも盛んに行われている。しかしDNA塩基配列と実際の生物との対応が不十分であるため、詳細なレベルでの生態学的考察には至っていないと認識

している。環境DNA調査からは、実体が分からない（環境DNAのみが知られる）ものが極めて多く得られているが、このことは原生生物における基礎的分類学的研究の遅れとともに、原生生物の種とDNA塩基配列の対応関係が極めて不十分であることを示している。

そこで本研究では、生態学的重要性が高いと思われる身近な湖沼をフィールドとし、そこで多様な原生生物を同定、単離し、環境DNA調査で広く用いられる18S rDNA等バーコードとなる塩基配列を得ることを行う。これによってDNA情報と形態に基づく分類学的情報の統合を進展させたい。この研究を行うにあたって、多様な原生生物の同定が最も重要になると思われるが、幸いに私は多様な原生生物に関しての分類学的知識を持ちあわせているため、それを効率的に応用できるものと考えている。このような分類同定能力を生かして近年の環境DNAと実際の生物の対応の不足に対して大きく貢献できるものと考えている。またこれによって普遍的湖沼での原生生物相のかなりの部分を明らかにすることができると思われる。このような環境における原生生物相を総合的に調査した例はほとんどなく、重要な知見になると思われる。

2. 研究の目的

近年、分子生物学的手法等の発展に伴い、原生生物の多様性についての認識が急速に高まっている。また環境DNA調査を用いて実際の環境における原生生物の多様性とその動態に関する研究も盛んに進められている。このような研究は実際の生態系を認識するために必須であると思われる。しかし一方で、原生生物においては基礎的な分類学的研究が十分でないため、環境配列と生物の実体がほとんど対応できていないのが現状である。そこで、私は広範な原生生物群に対する分類学的知識を持つことをベースとし、原生生物のさまざまな生物群に対してこのようなDNA情報と実際の分類学的情報の対応付けを行うことを目的とした研究を行いたい。対象となる環境としては、霞ヶ浦や筑波大学構内の池のような普遍的な淡水湖沼を対照とする。

3. 研究の方法

調査地として、最も身近な水圏環境である富栄養～中栄養の淡水湖沼を設定することとした。このような環境は生態学および社会との関連の上からも最も原生生物相の解明が望まれる環境の一つだと考えた。多様性を把握するためには頻繁な採集が必要と思われるため、なるべくアクセスがしやすい場所が望ましい。そこで、霞ヶ浦および筑波大学構内の池を調査地とした。霞ヶ浦については人間生活との関わりが極めて深い湖沼であり、他の機関による情報もかなり多いため、

有用だと考えた。また筑波大学構内には主に3つの湖沼があり、事前調査からかなり原生生物相が異なることを確認していたため、多様な生物を得るために適当であると考えた。調査地からプランクトンネット、直接採水、沈殿物採取などによって試料を採取した。これまでの観察からも原生生物相の変遷は極めて早いことが予想されたため、頻繁な採集を行った。試料からの原生生物の単離にはいくつかの手法が考えられたが、光学顕微鏡下での確認によって目的のものが得られるマイクロピペット法を中心に行った。またその小ささから見逃されることが多いピコプランクトン性の生物に対しても注意を払った。基本的には単離細胞からの培養株作成を目指し、さまざまな培地や（従属栄養性原生生物の場合は）餌生物との二員培養を検討した。基本的に採集試料から直接同定を行ったが、確立した培養株に関しては重点的な光学顕微鏡観察、および必要に応じて電子顕微鏡観察を行い、同定を行った。培養株からDNAを抽出、PCRによって18S rDNAを中心としたバーコード配列を増幅、塩基配列決定を行った。

4. 研究成果

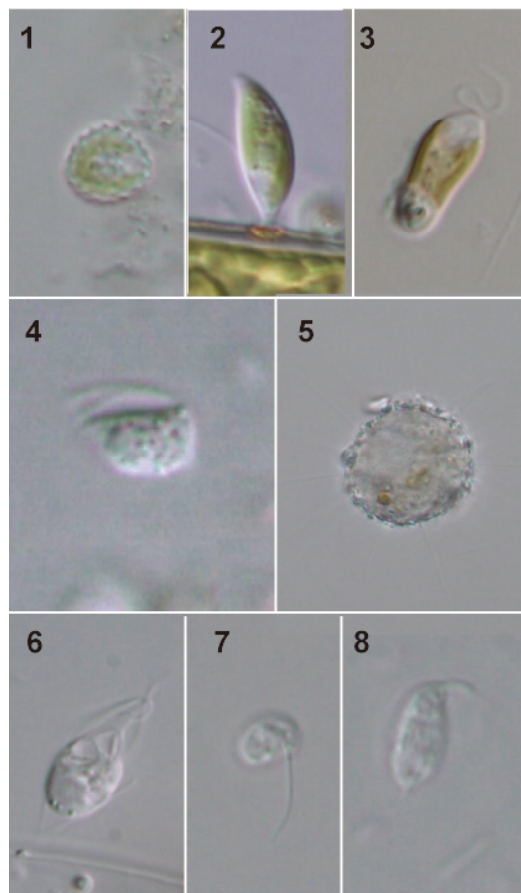


図 本研究で確認されたこれまで本邦で報告がないと思われる原生生物. 1. *Trachydiscus*, 2. *Pseudocharaciopsis*, 3. *Pavlova*, 4. *Cyathobod*, 5. *Lithocolla*, 6. *Histiona*, 7. *Ancyromonas*, 8. *Amastigomonas*

筑波大学構内の池および霞ヶ浦に生育する原生生物相を、光学顕微鏡および分子形質を基に明らかにした。その結果、両湖沼において、それぞれ600種以上の原生生物が確認された。その中には、本邦でこれまで正式な報告がないものや（e.g. *Pseudocharaciopsis*, *Ancyromonas*, *Amastigomonas*）、新規分類群も含まれた（上図）。

これらの観察を通して、本邦の一般的な湖沼で一般的な原生生物相（特に微細藻類相）をかなりの程度種レベルで明らかにすることができたと考えている（下図）。

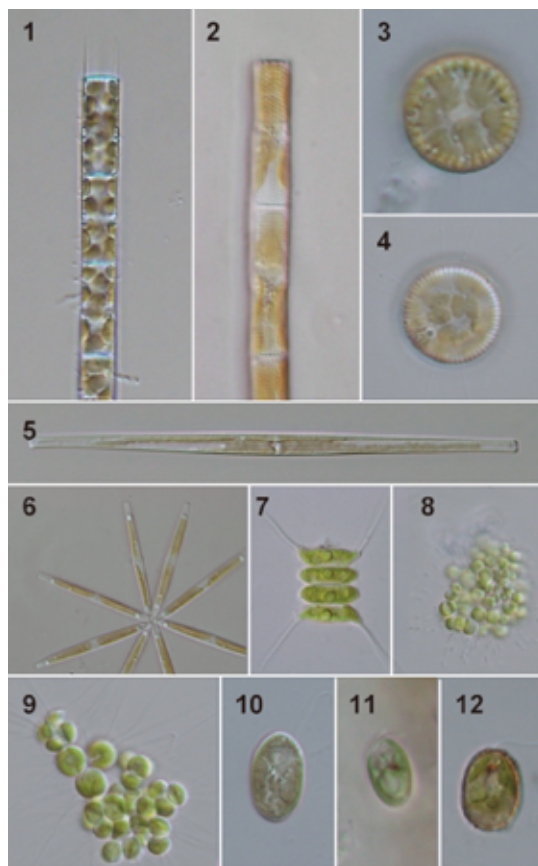


図 複数の湖沼で普遍的に見られた種. 1. *Aulacoseira granulata*, 2. *A. ambigua*, 3. *Cyclotella meneghiniana*, 4. *Cyclostephanos dubius*, 5. *Ulnaria japonica*, 6. *Nitzschia fruticosa*, 7. *Desmodesmus quadricauda*, 8. *Myconastes* sp. 9. *Micractinium pusillum*, 10. *Cryptomonas curvata*, 11. *Chroomonas* sp. 12. *Trachelomonas scabra*

プランクトン性原生生物の生産者としては珪藻類（*Aulacoseira*, *Actinocyclus*, *Cyclotella*, *Cyclostephanos*, *Stephanodiscus*, *Discostella*, *Skeletonema*, *Asterionella*, *Fragilaria*, *Ulnaria*, *Belonastrium*, *Nitzschia*,

Tryblionella など)、緑藻類 (*Chlamydomonas*, *Pteromonas*, *Pandorina*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*, *Mychonastes*, *Micractinium* など)、黄金色藻 (*Synura*, *Mallomonas* など)、クリプト藻 (*Cryptomonas*, *Chroomonas*, *Plagioselmis*)、渦鞭毛藻 (*Nusuttodinium*, *Peridinium*, *Peridiniopsis* など) ユーグレナ藻 (*Euglena*, *Tracheromonas* など) が、低次捕食者としては黄金色藻 (*Spumella*, *Paraphysomonas* など)、ビコソエカ類 (*Bicosoeca*)、キネトプラスト類 (*Neobodo* など)、繊毛虫 (*Strombidium*, *Tintinnopsis* など) が普遍的であった。これらの普遍種に関して、形態・DNA 情報が得られたことから、今後の普遍的湖沼の原生生物相解析や生態的研究に有用な基礎情報になると思われる。ただし今回の調査では、底生性原生生物の種組成に関しては、場所による違いが非常に大きく、“普遍的な”底生性原生生物相を明らかにすることはできなかった。この点に関しては今後の課題である。

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 2 件)

1. Nakayama, T., Nakamura, A., Yokoyama, A., Shiratori, T., Inouye, I., & Ishida, K. I. Taxonomic study of a new eustigmatophycean alga, *Vacuoliviride crystalliferum* gen. et sp. nov. *Journal of Plant Research*, 128, 2015, 249-257. doi:10.1007/s10265-014-0686-3 査読あり

2. Fukuda, S. Y., Iwamoto, K., Atsumi, M., Yokoyama, A., Nakayama, T., Ishida, K. I., et al.. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. *Journal of Plant Research*, 127, 2014, 79-89. doi:10.1007/s10265-013-0596-9, 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 南波紀昭・石田健一郎・中山剛、キセルガイ着生藻の分類学的研究、日本植物分類学会、2017年3月10日、京都大学(京都府、京都市)

2. 加藤孝一郎・八畑謙介・中山剛、新規寄生性ミドリムシの系統分類学的研究および寄生様式の解明、日本藻類学会、2014年3月15日、東邦大学(東京都、大田区)

[図書] (計 3 件)

1. Nakayama, T. & Yokoyama, A. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Syllabus of Plant Families - A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien Part 2/2: Photoautotrophic eukaryotic Algae-Rhodophyta. 2017, 171 (19-30).

2. Nakayama, T. Springer, Biology, Diversity and Ecology of Free-Living Heterotrophic Flagellates. In: Horiguchi, T. (ed), *Marine Protists*, 2015, 517 (63-87).

3. Kawai, H. & Nakayama, T. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Syllabus of Plant Families - A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien Part 2/1: Photoautotrophic eukaryotic Algae. 2015, 324 (22-64, 103-109, 118-139, 178-189).

[その他]

霞ヶ浦のプロテリスト

(<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~algae/PoK/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 剛 (NAKAYAMA, Takeshi)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：40302369