

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06387

研究課題名(和文) 干潟生態系における真核微生物の多様性と生態学的役割の解明

研究課題名(英文) The study on diversity and ecological roles of microbial eukaryotes in tidal flats

研究代表者

瀧下 清貴 (Takishita, Kiyotaka)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：90392951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：干潟は高い生物多様性を有する環境であるが、当該環境に生息する原生生物(真核微生物)に関する情報は少ない。本研究では、博多湾の和白干潟の底泥およびそこに生息するアサリから原生生物由来18S rRNA遺伝子のPCR検出を試みた。その結果、多様な原生生物に由来する塩基配列を得た。得られた結果に基づいて、干潟では多様な原生生物が低次捕食者、分解者および寄生者として生態学的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまでブラックボックスであった干潟生態系における真核微生物の多様性が明らかとなり、当該生態系全体をより詳細に把握することが可能となった。干潟には優れた水質浄化機能や防災機能があるだけでなく、潮干狩りやバードウォッチング/散策の場として人間社会と密接なつながりがあり、世界、国、地方自治体、NPO法人等、様々なレベルでその保全活動が行われている。しかし、そうした活動では人間の目に見える動植物のみを対象としている場合が圧倒的に多い。本研究で得られた成果を学術コミュニティだけではなく一般社会にも発信することは、干潟生態系をより正確に把握した保全活動の提言にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Tidal flats are ecologically important as they support a large community of animals (e.g. crabs, mollusks, and polychaetes) and restore water quality. However, information regarding microbial eukaryotes inhabiting these environments is limited. In the present study, utilizing polymerase chain reaction (PCR) techniques, we detected fragments of 18S rRNA gene of protists from tidal sediment and from the gill tissues of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Wajiro tidal flat, Hakata Bay, Japan. Based on the diversity of 18S rRNA gene, microbial eukaryotes play important ecological roles as grazers, decomposers and parasites in these environments.

研究分野：原生生物学

キーワード：原生生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

干潟は「生物多様性の宝庫」「生命のゆりかご」という言葉で表現されるように、生態学的に極めて重要な環境である。実際、干潟には二枚貝類、カニ類、ゴカイ類等の多様なマクロベントス(底生動物)が生息しており、それらを対象とした生態学的研究がこれまで精力的に行われてきた。しかし、人間の目には見えない微生物、特に単細胞性の真核微生物(主に原生生物)の多様性や生態に関する知見は極めて乏しい状況にある。例えば、干潟の底泥表面に生息する付着珪藻類は当該環境の一次生産者(有機物の生産者で生態系の出発点)としての役割をもつことは知られているものの、その一次生産者を捕食する真核微生物として、どのような種が存在するのかについての知見はほぼ皆無である。また、高次捕食者である底生動物の死骸等を分解する真核微生物の多様性も十分に明らかにされていない。さらに、干潟に生息する底生動物の体内あるいは体外には寄生性の真核微生物は存在するのか?存在するとしたらどのような種なのか?それらの寄生生物は、宿主生物さらには干潟生態系にどのような影響をおよぼしているのか?等についても詳しく把握されていない状況にある。これらは、いずれも干潟生態系をより正確に把握するために解決しなければならない問題である。

### 2. 研究の目的

主に分子生物学的手法を用いて、干潟生態系において低次捕食者および分解者としての役割をもつ真核微生物、さらには高次捕食者に寄生する真核微生物の多様性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

和白干潟の底泥を採取し、そこから肉眼で確認できる動物を取り除いた後に、専用のキットを用いて泥からDNAを直接抽出した。そのDNAを鋳型として真核生物由来の18S rRNA遺伝子をPCR増幅した。PCR増幅産物はIllumina MiSeqに供し、環境DNAメタバーコーディング解析を行なった。得られた遺伝子情報を相同性検索に供することによって分子同定を行い、捕食者・分解者である真核微生物の多様性を種・属レベルで把握した。また、和白干潟に生息するアサリのエラ組織から、専用のキットを用いてDNAを抽出した。そのDNAを鋳型とし、多細胞動物以外の真核生物(つまり寄生性真核微生物)に由来する18S rRNA遺伝子を増幅することができるプライマーを用いてPCR(Bower et al. 2004)を行なった。得られたPCR増幅産物は、サンガー法を用いてその塩基配列を決定し、相同性検索および分子系統解析に供することで由来生物(寄生性真核微生物)の分子同定を行なった。Bower et al. (2004)に従い、PCRの際にはアニリング温度を50-60の範囲内で数段階設定し、あらゆる分類群の真核微生物を網羅的に検出できるように工夫した。

### 4. 研究成果

Illumina MiSeq解析の結果、干潟底泥中では単細胞の藻類である珪藻類が圧倒的に優占していることが明らかとなった。珪藻類は光合成を行い、干潟において一次生産者としての役割を果たしていると考えられる。また、繊毛虫類に由来する配列も多く得られた。繊毛虫は当該環境で低次捕食者としての役割を果たしていると考えられる。さらに、菌類、襟鞭毛虫類、イクチオスポラ類といった真核微生物の存在が確認され、それらが干潟における低次捕食者あるいは分解者として生態学的に重要な役割を果たしていることが示唆された。アサリにおける寄生虫PCR検出実験では、*Perkinsus olseni*が全個体から検出され、その高い感染率が確認された。*P. olseni*は日本沿岸域で広範囲にわたって確認されており、日本産アサリの生産量激減に深く関わっていることが示唆されている。また*Perkinsus*以外に、繊毛虫類、キネトプラスト類、略胞子虫類に由来する遺伝子配列が検出された。繊毛虫類では、*Trichodina*属や*Ancistrum*属以外に、層状咽頭綱の吸管虫亜綱に属するこれまでに知られていない新規な種の存在が確認された(図1)。その新規な繊毛虫に由来する配列は、腹足類である*Dicathais orbita*から得られた環境クローン配列(Laffy et al. 2009)や、深海の熱水噴出口付近に生息するシロウリガ

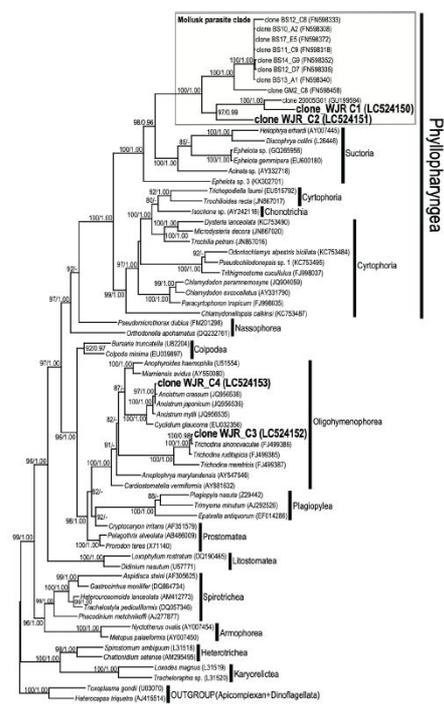


図1. 繊毛虫類の18S rRNAに基づいた系統樹

イ類やイガイ類などの二枚貝から検出された環境クローン配列 (Sauvadet et al. 2010) に近縁であり,これらの環境クローン配列と吸管虫類の系統内で単独の系統を形成したため,吸管虫亜綱の中には貝類に特異的に寄生する未知のグループが存在する可能性がある。キネトプラスト類由来の配列は,淡水魚の体表や鰓に寄生することでイクチオボド症という感染症を引き起こす病原体として有名な *Ichthyobodo necator* に近縁であった。略孢子虫類由来の配列は,スペイン産のヨーロッパアサリから検出された略孢子虫に由来する配列と近縁であり (図 2), さらに韓国産アサリに寄生する吸虫 *Parvatrema duboisi* から検出された "hyperparasite" である *Urosporidium* の配列とほぼ一致した。したがって本研究で検出された略孢子虫も同様に hyperparasite である可能性が高い。

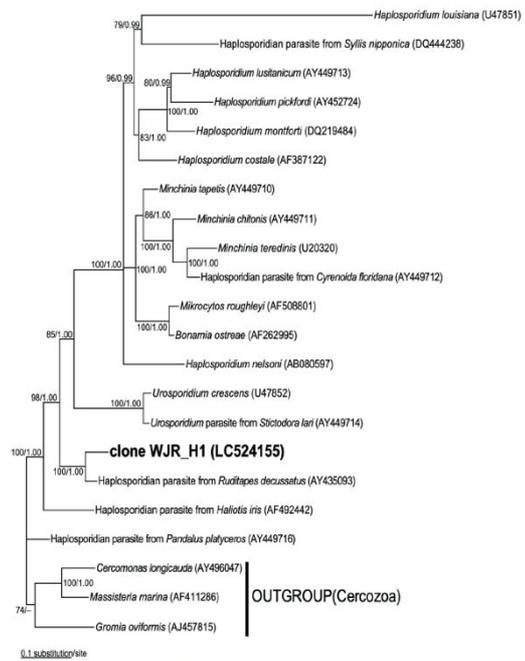


図2. 略孢子類の18S rRNAに基づいた系統樹

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakaguchi SO, Ogawa G, Kasai H, Shimizu Y, Kitazato H, Fujikura K, Takishita K	4. 巻 27
2. 論文標題 Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan, and possible sources of their infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aquaculture International	6. 最初と最後の頁 1739-1749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10499-019-00427-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi K, Sakai K, Fukasawa W, Nagano Y, Sakaguchi SO, Lima AO, Pellizari VH, Iwatsuki M, Takishita K, Yoshida T, Nonaka K, Fujikura K, Omura S	4. 巻 71
2. 論文標題 Quellenin, a new anti-Saprolegnia compound isolated from the deep-sea fungus, Aspergillus sp. YK-76	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 741-744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-018-0053-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takishita K, Kawai R, Tsutsumi A, Tanifuji G, Otsubo M	4. 巻 86
2. 論文標題 Molecular detection of protists associated with the Manila clam Ruditapes philippinarum inhabiting the Wajiro tidal flat in Hakata Bay, Fukuoka Prefecture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 633-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-020-01435-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------