

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580289

研究課題名(和文) 海底堆積物中で展開されるツボカビと有害・有毒渦鞭毛藻の寄生関係

研究課題名(英文) Host-parasite relationship between chytrid and harmful dinoflagellates in sediment of the marine environment

研究代表者

山口 峰生 (Yamaguchi, Mineo)

独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主幹研究員

研究者番号：00371956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海底堆積物中に存在する渦鞭毛藻のシスト自体あるいは発芽細胞に寄生する微生物の正体を明らかにするため、形態および分子系統学的解析を行った。その結果、外部寄生する菌類は、フタナシツボカビ目およびロブロミケス目のツボカビであることが判明した。大船渡湾からは培養可能なフタナシツボカビ目の分離に成功した。一方、内部寄生者は、広義のツボカビ類に属する新規菌類であると考えられた。この結果は、海産渦鞭毛藻には多様な寄生性ツボカビが存在していること、そして、それらの個体群動態を理解するには、「寄生」を考慮することが不可欠であることを示している。

研究成果の概要(英文)：During the germination experiments of the cysts by incubating sediment suspensions, we have found epibiotic and endobiotic fungal parasites on the germinated cells and/or the cysts of marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Scrippsiella trochoidea*. In the present study we characterized and identified these fungi by microscopic observation and rDNA sequence analysis. Results showed that the epibiotic fungi belonged to the Rhizophyidium clade or Lobulomycetales, Chytridiomycota. We also succeeded in obtaining culturable strain of Rhizophyidium from Ofunato Bay for the first time. Although taxonomic position of the endobiotic fungus yet to be identified, it belonged to neither "core chytrid clade" nor Oomycota. Our finding indicates that a variety of fungal parasites can have significant impacts on marine dinoflagellates and parasitism needs to be considered in understanding of their bloom dynamics.

研究分野：海洋環境微生物学

キーワード：菌類 ツボカビ 有毒プランクトン 寄生 渦鞭毛藻 海洋 海底堆積物

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻類には現生種で 2000 種が知られており、海域における一次生産者として重要な生物群である。その一方で、渦鞭毛藻は、赤潮や貝毒など有害藻類ブルーム (Harmful Algal Blooms; HAB) の原因生物として極めて重要な藻類でもある。全地球規模で HAB の発生頻度の増加、分布域の拡大、及びそれに伴う漁業被害が深刻な問題となっている。そのため、これまで以上に HAB 発生機構の解明や、予察・防除技術の開発が喫緊の課題となっているが、その課題を克服するには、HAB 原因生物の個体群動態に及ぼす物理、化学および生物学的要因の影響を明らかにする必要がある。海域に発生する渦鞭毛藻の消滅に関わる微生物要因としては、殺藻細菌やウイルスが報告され、その分類、生態および系統解析が進められている。しかし、他の微生物、とくに真菌類や偽菌類に関する知見は皆無に等しい。

湖沼などの淡水域では、1900 年代中頃から、真菌 (ツボカビ類) が湖沼の植物プランクトンの個体群動態に大きな影響を及ぼす生物要因として注目され、多数のツボカビが分類・同定されている。近年では、分子生物学の発展により、それらの分子系統解析が進められるとともに、ツボカビと植物プランクトンの相互関係 (共進化) やツボカビが食物網の中で果たす役割について研究が進められている。最も有名な例は、珪藻 *Asterionella formosa* に寄生するツボカビ *Rhizophydium planktonicum* であり、淡水域における真菌類—寄主関係のモデル生物と位置付けられている。一方、水産学上重要な海生の菌類としては、魚類や養殖ノリの病原菌として卵菌類、接合菌および不完全菌が知られている。また、海産植物プランクトンに寄生する卵菌類 *Lagenisma* 属、*Ectrogella* 属も報告されているが、これらは系統学的に真菌とは異なり、珪藻類と同じ不等毛植物門に属する。さらに、珪藻類に寄生する真菌 (ツボカビ) として *Olpidium* 属と *Rhizophydium* 属が報告されているが、それらの分類、生理・生態に関する知見はなく、淡水域に比べ海生の真菌類に関する研究は非常に立ち後れているのが現状である。

ツボカビ類は真菌の中で、唯一、鞭毛と遊走子といった祖先的形質を持つグループである。菌類の初期進化はツボカビ類を起源とし、カンブリア紀以前に水環境から陸環境へ進出したと考えられている。しかし、ツボカビは淡水や陸環境から多く分離・報告されているが、海生種の報告は極めて少ない。近年、菌類に関する重要な国際会議が立て続けに開催された。まず 2010 年 8 月には、英国エジンバラで国際菌学会議 (IMC9) が、また 2011 年 9 月には札幌で国際微生物学連合 2011 会議 (IUMS2011) が開催された。前者では、「原始的な菌類の進化と種多様性」が、後者では「菌類における初期分岐系統群に関

する最近の研究の進展-進化、系統、多様性」と題した下等菌類の進化、分類、多様性に関するシンポジウムが開催されたことは、ツボカビを含む下等菌類が国際的にも非常に注目されていることを示すものである。とりわけ、申請者が参加できた IUMS2011 では、会場からも海生菌類の調査・研究の重要性を指摘する声が上がっていた。

2. 研究の目的

申請者らは、HAB の発生にはシストなどの休眠期細胞が重要な役割を果たしていると考え、これまでその形成、休眠、発芽に関する研究を実施してきた。その過程で、有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* シストから発芽した栄養細胞に寄生する菌類を三河湾海底泥から発見し、その形態的な特徴などから、本菌がツボカビ門ツボカビ目に属する真菌類の一種であることを明らかにした。海産渦鞭毛藻に寄生する真菌の発見は、これが世界で初めての事例である。さらにごく最近、別の海域の *A. tamarense* や他種渦鞭毛藻シストに寄生する真菌を発見するに至り、海生の寄生性真菌類が予想以上に多様な生物群から構成されており、その寄主となる渦鞭毛藻の個体群動態に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。

そこで本研究では、海産渦鞭毛藻を寄主とするツボカビを様々な海域で探索し、得られた菌類について、形態および寄生過程を観察するとともに、現場におけるそれらの生態解明に必要な分子モニタリング手法の基盤となる分子系統学的な特徴を把握することにより、大幅に不足している海産寄生性ツボカビについての体系的なデータの蓄積と海洋生態系における多様性と機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 海産渦鞭毛藻を寄主とするツボカビの探索

日本沿岸域においてコアサンプラーによる採泥を行い、一定温度下で保存して持ち帰る。得られた海底泥試料について、プランクトンネットによるサイズ分画、超音波処置を行い、泥懸濁液を調製する。これを一定温度、明暗周期のもとで培養し、光学顕微鏡観察を行って寄生性ツボカビおよびそれらの遊走子が付着した寄主細胞を探索する。探索効果を高めるため、過去の統計資料を基に HAB の発生しやすい海域を選定するとともに、各試料を固定し、プリンムリンおよびカルコフロールなどの蛍光試薬を用いた蛍光染色法によってツボカビや渦鞭毛藻シストの分布密度を予め把握しておく。

(2) 形態学的特徴の把握

探索でみとめられた寄生性ツボカビについて分離・培養を行い、菌体の特徴 (形状、サイズ、色調、棘など修飾の有無、仮根) を光学顕微鏡により把握する。また、培養過程

での形態の経時変化を調べるとともに、遊走子嚢（形状、サイズ、遊走子放出管の形状・数、蓋（Operculum）の有無）および遊走子の形態（サイズ、鞭毛の形状・数、内部構造）を明らかにする。ツボカビ門においては、とくに遊走子の構造が形態分類の重要な基準とされていることから、走査電顕および透過電顕を用いてその微細形態を精査する。得られた形態学的特徴を既存の文献を参照し、分類学的検討を行う。

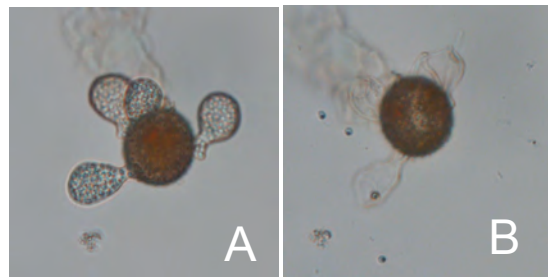
(3) 分子系統解析

寄生性ツボカビの菌体を分離し、DNA 抽出後、リボゾーム遺伝子（rDNA ; 18S, 28S, ITS など）の PCR 増幅、電気泳動、バンドの切り出し、プラスミドベクターへのライゲーション、を行い DNA シーケンサーにより塩基配列を決定する。得られた塩基配列データについて MEGA による分子系統解析を実施する。なお、菌種内の遺伝的多様性を考慮し、分子系統解析は基本的にクローン菌体（1 遊走子嚢単位）で行う。そのため、顕微鏡下でガラスキャピラリーなどを用いて寄主細胞から遊走子嚢を 1 個ずつ分離する。また、PmTG 寒天培地などを用いて、ツボカビの継代培養を試みる。

4. 研究成果

前年度に発見した *Scrippsiella* 属と思われるシスト本体に寄生する菌の形態と分子系統を精査した（図 1）。光学顕微鏡による形態観察の結果、遊走子嚢は寄主への付着部部分が細く、先端が太い逆洋ナシ型を呈し、遊走子放出管に蓋が無い無弁型であった。遊走子は球形で大きな油球 1 個と鞭毛を 1 本有し、その逆方向に遊泳した。鞭毛の全長は遊走子頭部の約 5 倍程度で、先に発見した *Alexandrium* 寄生菌に比べて短かった。以上の形態的特徴から本菌もツボカビの一種であると考えられた。さらに、本菌のリボゾーム遺伝子の塩基配列を決定したところ、2009 年に Simmons らによりツボカビ門内に認識されたクレードの 1 つであるロブロミセス目に近縁である可能性が示された。宿主シストについてもリボゾーム遺伝子塩基配列を決定した結果、これが *Scrippsiella trochoidea* のシストであることも判明した。これらの結果は、海産渦鞭毛藻のシストに直接寄生するツボカビの存在を初めて明らかにするものであるとともに、海産渦鞭毛藻に寄生するツボカビが多様なグループから構成されていることを示すものである。

日本沿岸海域におけるツボカビの探索を行うため、宮城県女川湾、気仙沼湾、岩手県大船渡湾、愛知県三河湾より採取した海底堆積物についてマツ花粉釣菌法による探索を行った結果、大船渡湾より新規菌類を分離することに成功した。得られたコロニーについて、PmTG 液体培地で限界希釈培養を行い、クローン株を得た。本株について、その形態と発達過程を光学および電子顕微鏡を用い



て

図 1. 仙台湾から発見した *Scrippsiella* シストに寄生するツボカビ（ロブロミセス目）。A:分離時点, B:14 時間後.遊走子が放出されている。

観察するとともに、rDNA の塩基配列を決定した。本菌は PmTG 寒天プレート上で白色のコロニーを形成し、海水ベースの PmTG 液体培地中でも良好に増殖した（図 2）。遊走子から新たな遊走子放出までの期間は約 10 日間であった。遊走子嚢は直径約 190 μ m の球形で、仮根が良く発達する分実性、単心性であった。放出管は数十個以上と多数あったが、蓋状の構造はみられなかった。遊走子は頭部が約 2 μ m の球形で、後端に長さ約 26 μ m のムチ型鞭毛 1 本を有していた。遊走子内にはマイクロボディ—脂質小球粒複合体（MLC）とリボゾームが細胞中央にまとまり、その周囲に核と数個のミトコンドリアが位置した。また、脂質粒子の細胞壁側にはランボソームがみられた（図 3）。SSU rDNA 塩基配列は本菌が *Rhizophyidium* クレード内に位置することを示し、また LSU rDNA 塩基配列は Amon(1984) が緑藻ミルから分離した *R. littoreum* とほぼ一致した。植物プランクトンへの寄生の有無を調べるため、遊走子を珪藻 1 種、渦鞭毛藻 3 種と混合培養した結果、*Alexandrium tamarense* のみで遊走子嚢の成熟と新たな遊走子の放出がみとめられた。しかし、遊走子嚢は PmTG 培養の 1/10 程度にまでしか成長せず、本菌は必ずしも生きて細胞を必要しない条件的寄生菌と考えられた。今回、継代が可能な海産の寄生性ツボカビの培養株を確立できたことは、今後の各種性状解析や分子モニタリング技術の開発に極めて重要である。



図 2. 大船渡湾から分離された海産ツボカビ *Rhizophyidium*. 左：寒天プレート上のコロニー、右：成熟した遊走子嚢。

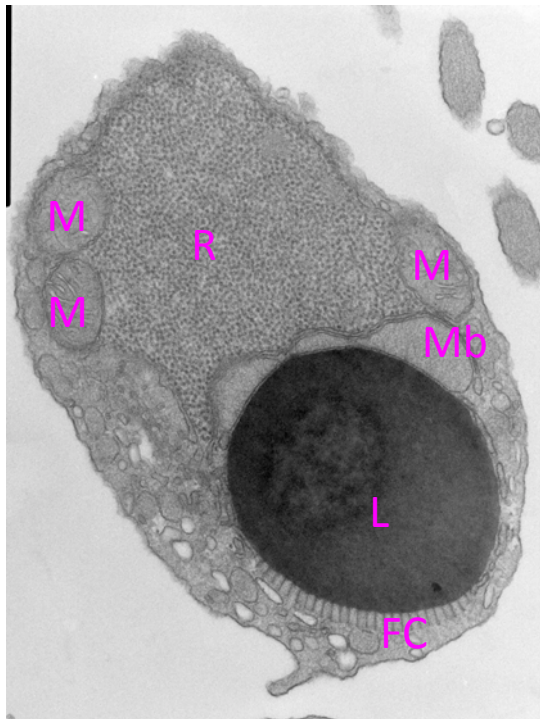


図 3. 大船渡湾から分離された海産ツボカビ *Rhizophyidium* 遊走子の微細構造。

N: 核, L: 脂質顆粒, FC: ランポソーム, R: リボゾーム, M: ミトコンドリア, Mb: ミクロボディ。

これまでの解析により、三河湾および大阪湾から発見された有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* に寄生するツボカビはそれぞれ別のクレードに属することが明らかとなっていた。2014年にフランスで新種記載されたツボカビ *Dinomyces arenysensis* のリボソーム遺伝子配列データを加えて再解析したところ、大阪湾産ツボカビは *D. arenysensis* と同じクレードに属するが、三河湾産はそれとは別のクレードに位置した。このことから、本邦産の *Alexandrium* に寄生するツボカビは少なくとも2種存在することが明らかとなった。また、大船渡湾から *Alexandrium tamarense* の休眠シストに内部寄生する菌を発見した。寄生初期にはシスト内部に顆粒状の構造が見られ、時間の経過とともに遊走子が形成された。その後、シスト表面からパピラ様構造が突出し、その先端から遊走子が放出された。遊走子は3 μ mの球形で大きな脂肪粒を1個有し比較的ゆっくりと遊泳した。遊走子は長さ12 μ mの鞭毛1本と数本の糸状仮足様構造を有した(図4)。リボソーム遺伝子解析により、本種はコアではないものの、広義のツボカビに属する新奇菌類であると考えられた。この菌は現場および培養シストにも寄生することが確認でき、継代培養が可能であると考えられた。さらに、同海域から2種の寄生性真核微生物も新に発見された。それらの形態学および遺伝子解析結果から、一つはアルベオ

ラータに属する新種、もう一方はリザリアに属するネコブカビ類の一種であることが判明した。以上のように、*Alexandrium* には極めて多様な寄生性真核微生物が存在することが明らかになった。以上の結果は、海洋生態系の構造と機能を理解する上で、また、有毒プランクトンの生物学的防除の候補として、これら寄生生物の生理・生態特性の解明が極めて重要な研究テーマとなることを示すものと考えられる。近年、FTOL (Assembling Fungal Tree of Life) や Deep Hypha などの大規模プロジェクトにより、菌界の分類体系の全面的な見直しが行われている。ツボカビ門についても、これまでの1門から3門(ツボカビ門、ネオカリマスチクス菌門、コウマクノウキン門)に解体されるなど、大幅な再編が行われた。本研究により、これまで知見が乏しかった海生真菌について新たな生物学的な情報の充実が図られ、菌類系統進化の解明に貢献することも期待される。

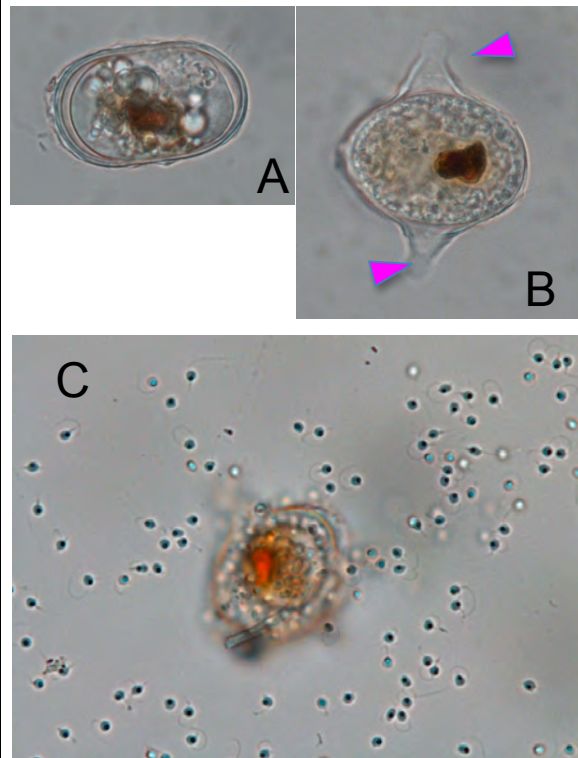


図4. *Alexandrium tamarense* の休眠シストに内部寄生する広義のツボカビ。A: 寄生初期, B: 寄生4日目, パピラ構造(△印), C: 寄生5日目, 遊走子放出中。

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)

[学会発表] (計6件)

山口峰生, 坂本節子, 海産渦鞭毛藻に寄生するツボカビの形態学的特徴と分子系統解析,

2013年日本ベントス学会・プランクトン学会合同大会，2013年9月29日，東北大学（仙台）

山口峰生，坂本節子，木村圭，加賀新之助，加賀克昌，内記公明，有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* に寄生する真核微生物，平成26年度日本水産学会春季大会，2014年3月28日，北海道大学（函館）

山口峰生，坂本節子，岩手県大船渡湾から分離された海産ツボカビ *Rhizophyidium* について，日本菌学会第58回大会，2014年6月15日，サイエンスヒルズ小松（小松）

山口峰生・木村圭・坂本節子，海産渦鞭毛藻に寄生する真核微生物の多様性，日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会，2014年9月6日，広島大学（東広島）

Yamaguchi M, Kimura K, Sakamoto S, Kaga S, Kaga Y, Naiki K, Morphological and molecular characterization of eukaryotic parasitoids on toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, The 16th International Conference on Harmful Algae, 2014年10月27日，Michael Fowler Centre, ウェリントン（ニュージーランド）

山口峰生，坂本節子，木村圭，加賀新之助，加賀克昌，内記公明，有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* に寄生する真核微生物-II—シスト寄生菌および培養可能ツボカビの形態・分子系統学的特徴—，平成27年度日本水産学会春季大会，2015年3月28日，東京海洋大学（東京）

〔その他〕

ホームページ等

山口峰生，講演：HABとパラサイト，漁場環境保全関係研究開発推進会議赤潮・貝毒部会，2011年12月5日，広島市国際会議場（広島）

6. 研究組織

1) 研究代表者

山口 峰生 (YAMAGUCHI MINEO)

水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・環境保全研究センター・主幹研究員

研究者番号：00371956