

令和 元年 6 月 26 日現在

機関番号：12701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2018

課題番号：15KK0026

研究課題名（和文）湖沼および海洋におけるツボカビの多様性と機能評価：検出方法の開発と物質流の定量化（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Diversity and functions of chytrids in lakes and oceans: Development of detection methods and quantifying material flows(Fostering Joint International Research)

研究代表者

鏡味 麻衣子 (KAGAMI, Maiko)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：20449250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：基盤研究Bを発展させ国際共同研究では、おもにドイツおよびオランダと共同で、世界中の湖沼および海洋に出現するツボカビの多様性と機能の解明を目指した。次世代シーケンシングとSingle Cell PCR法、単離培養および顕微鏡観察を組み合わせ、寄生性ツボカビのゲノム（リボソームDNA）、形態分類、機能を一致させたデータベースを構築した。また野外操作実験、室内培養実験および数理モデル解析を行い、ツボカビの物質循環における機能、とくにバクテリアや動物プランクトンに与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ツボカビはカエルツボカビ症の蔓延や有害・有用藻類への寄生が発見されたことで、近年その重要性への認識が世界的にも高まっている。しかし、方法的な制約から実際に研究を進めているのは国内外問わず限られていた。今回、ドイツとオランダとの共同研究を行ったことで、ヨーロッパ諸国やアメリカとの共同研究へと発展させることで、ツボカビの国際的なデータベースの整備が進んだ。このデータベースがツボカビ感染症の制御や発生予測の現場においても活用され、水質や水産資源管理の上でも役立つ可能性が高い。また、温暖化や富栄養化に伴う湖沼・海洋生態系の変遷など、水圏生態系の保全にも役立つものである。

研究成果の概要（英文）：We aim to reveal the hidden diversity of chytrids and functions in lakes and oceans under the collaboration with Germany (IGB-Berlin) and the Netherlands (NIOO-KNAW). Combining molecular techniques (High throughput sequencing and Single cell PCR) with isolation or microscopic observations are powerful tools, by which we indeed discovered novel chytrid lineages infecting phytoplankton. Chytrids play important roles in material cycling, as a excellent foods for zooplankton. In addition, chytrids affect the bacteria community through modifying algal quality.

研究分野：生態学

キーワード：物質循環 湖沼 環境変動 生物多様性 菌類 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

ツボカビとは、鞭毛を持つ遊走子を作る真菌類の総称で、植物プランクトンやカエルなどに寄生する種や、花粉など有機物を分解する種など 1000 種類以上報告されている。近年、DNA 解析により湖沼や海洋に多様なツボカビが存在している事があきらかとなってきた。またツボカビはミジンコなど動物プランクトンの重要な餌となり、ツボカビを介した物質流 Mycoloop は水圏の物質循環において重要な役割を担うことが明らかになりつつある。しかし、形態的特徴が乏しく観察だけでは鞭毛虫など他の生物と間違い計数されてしまう。また DNA の登録データ不足のため、環境中から抽出した DNA シークエンス情報だけではツボカビの種名や機能を同定することは不可能である。

研究代表者らはツボカビの 1 孢子体から DNA を抽出解析する方法 (Single Spore PCR 法と命名) を開発し、野外における存在状態 (植物プランクトン寄生性、花粉分解性など) と孢子体の形態を把握した上で、DNA シークエンス情報を得る事を可能とした。その結果、琵琶湖や印旛沼において、ツボカビの新規系統や、近年新たに提唱された系統群 (Cryptomycota, Aphelida) を含む多様な菌類が植物プランクトンに寄生する事が明らかとなった。

同時に、野外におけるツボカビ生物量とツボカビを介した物質流 Mycoloop の重要性について定量的に評価し、物質循環におけるツボカビの機能の解明を目指した。モノクローナル抗体、定量 PCR 法、FISH 法を検討したが、多様なツボカビを対象にした場合には定量 PCR 法の適用が好適であることが明らかとなった。また、定量 PCR 法を応用し、ミジンコ消化管内に含まれるツボカビの DNA 量を測定する事に実験環境下で成功した。

## 2. 研究の目的

国際共同研究では、これまでの成果を踏まえ、目的を拡張し、世界中の湖沼および海洋に出現するツボカビの多様性と機能の解明を目指した。最新の解析技術を用いて ツボカビのゲノム、形態分類、機能を一致させたデータベースを構築した。 また大規模操作実験を行い、ツボカビの物質循環における機能を定量的に把握し、ツボカビの多様性と機能を考慮にいれた物質循環モデルを提示した。

## 3. 研究の方法

2016 年 4 月から 2017 年 6 月まではドイツ研究所 Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB-Berlin) に滞在し、2017 年 7 月から 9 月まではオランダの研究所 Netherlands Institute of Ecology (NIOO) に滞在し、共同研究を行った。

### 研究 ツボカビのデータベース構築：ゲノム、種名、機能の一致

研究代表者らが開発した Single Spore PCR 法は有用であるが、ツボカビの孢子体を湖水からピックアップするのは非常に手間がかかる上、得られる DNA が微量のため PCR 増幅やシークエンスの成功率が低い。そこで、Single Spore PCR 法とドイツの研究所 (IGB-Berlin) にある最先端の技術 (次世代シークエンサー、フローサイトメーターなど) を組み合わせることで、精度と効率をあげて大量の試料を処理する方法を検討した。

また世界各地の湖沼・海洋の試料を解析することでデータベースの充実化をはかった。同時に世界各地で単離培養に成功し維持されているツボカビの代表的な種について、系統解析と電子顕微鏡観察に基づく形態分類を行った。このことにより、ゲノム、系統分類、機能を完全に一致させたデータベースを構築した。

### 研究 ツボカビの物質循環における機能評価：大規模操作実験による Mycoloop の定量化

大規模操作実験と数理モデルを用いてツボカビの有無やツボカビの多様性が、植物から動物への栄養転換効率やバクテリアの種組成、元素循環、食物網構造や安定性、元素の循環パターンにどのように影響するのかを検討した。具体的には、ドイツ (IGB-Berlin) とオランダ (NIOO) で操作実験を行い、ツボカビの成長に影響する環境要因 (水温、光、栄養塩濃度、動物プランクトン) を変化させ、ツボカビの種組成や密度の変化、動植物プランクトンなど生物群集にどのような影響がでるのかを解析した。その際、定量 PCR 法により多様なツボカビの種毎の生物量定量を試みた。

## 4. 研究成果

### 研究① ツボカビのデータベース構築：ゲノム、種名、機能の一致

ドイツの湖 Lake Stechlin を主な調査地として、ツボカビのデータベースを構築した。2016 年 4 月から 2017 年 6 月の間、湖水を定期的に採取し、湖水中に観察できた植物プランクトン寄生性ツボカビを対象に Single Spore PCR 法による DNA 解析および単離培養を行った。ツボカビの付着している植物プランクトンをセルソーターやフローサイトメーター、FlowCAM で識別し

ようとしたが、対象とする植物プランクトンの形態が多様であり、うまくいかなかった。顕微鏡下で蛍光染色により識別し写真撮影した上で、ピペットで植物プランクトンを1細胞(コロニー)ずつ拾うのがもっとも確実であった。Single Spore PCR法では、従来のサンガー法による塩基配列の解析にくわえ、次世代シーケンサー(PacBio, Oxford Nanopore)による解析を比較検討した。その結果、Oxford Nanoporeをもちいることで、リボソームDNA全領域をカバーする塩基配列解析を精度高く行うことが可能となった(業績4, Wurzbacher et al. 2019)。さらにツボカビとその宿主である藻類、および藻類もしくはツボカビに付着しているバクテリアや菌類の解析も可能となった。

単離培養に成功したツボカビのうち代表的な種について、分子系統解析、生活史観察、および電子顕微鏡観察による微細構造の観察に基づき分類・記載を行った。多くの種類が種以上のレベルで新しい分類群であり、新種・新属・新科の提唱を行なった(業績6, 10, 13, Seto et al. 2016, Van den Wyngaerd et al. 2017, 2018)。

#### 研究 ツボカビの物質循環における機能評価：大規模操作実験による Mycoloop の定量化

ドイツの湖 Lake Stechlin において多様なツボカビの出現した2016年6月と2017年6月に野外操作実験を行なった。動物プランクトンの密度を操作し、ツボカビへの影響を調べた。ツボカビの植物プランクトンへの寄生率を種類ごとに顕微鏡で計数するとともに、特定の種については生物量定量を定量PCR法により行った。その結果、動物プランクトンの中でもケンミジンコやミジンコといった大型の甲殻類動物プランクトンよりも、ワムシや繊毛虫といった原生動物など小型の動物プランクトンの方がツボカビの密度を減らし寄生率を減少させることが明らかとなった。

ドイツの研究所(IGB-Berlin)において、珪藻とツボカビの培養系を用いて、ツボカビの有無がバクテリアの量や種組成に与える影響について実験を行った。バクテリアの種組成はツボカビの有無によって異なり、さらに珪藻の状態(培養日数)によって異なることが明らかとなった。ツボカビは珪藻の状態を変化させることでバクテリアに影響を与えていることが示唆された。

オランダ(N100)では3つの操作実験を行った。1つ目の実験は3つの湖沼を対象に、水温、栄養塩濃度、動物プランクトンの密度を変化させ、ツボカビを含めた菌類群集に与える影響を検証した。菌類群集は湖沼によって明瞭に異なり、栄養塩が最も影響を与えるほか、水温や動物プランクトンの影響が顕著に出る湖もあった。2つ目の実験では、動物プランクトンのワムシがツボカビの寄生率に与える影響を検証した。ワムシはツボカビを捕食するがツボカビの藍藻に対する寄生率は減少させないことが判明した。数理モデル解析により、ワムシはツボカビを餌源とする限り、餌を極端に減少させることができないため、寄生率に影響を与えないことが明らかになった。3つ目の実験では、珪藻からツボカビ、ワムシへと物質がどの程度流れるのかを、炭素窒素安定同位体比を使って検証した。自然条件下での同位体比では明瞭な傾向は見られなかった一方、珪藻を安定同位体でラベルしたものでは、ツボカビやワムシへの炭素窒素の移行が検出することができた。

上記成果を論文にまとめている。加えて、ツボカビに関する総説(業績8, Frenken et al. 2017)、海洋における菌類に関する総説(業績2, Amend et al. 2019)、水生菌類全般に関する総説(業績1, Grossart et al. 2019)を共同研究者らと執筆した。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 20 件)

1. Hans-Peter Grossart, Silke Van den Wyngaert, Maiko Kagami, Christian Wurzbacher, Michael Cunliffe, Keilor Rojas-Jimenez (2019) Fungi in aquatic ecosystems. Nature Reviews Microbiology 17, 339-354. (査読有)
2. Anthony Amend, Gaetan Burgaud, Michael Cunliffe, Virginia Edgcomb, Cassandra Ettinger, MH Gutiérrez, Joseph Heitman, Erik Hom, Giuseppe Ianiri, Adam Jones, Maiko Kagami, Kathryn Picard, Alisha Quandt, Seshagiri Raghukumar, Meritxell Riquelme, Jason Stajich, Jose Vargas-Muñiz, Allison Walker, Oded Yarden, and Amy Gladfelter (2019) Fungi in the marine environment: open questions and unsolved probl. mBio 10(2) e00189-18. (査読有)
3. Yuichiro Kashiya, Akiko Yokoyama, Takashi Shiratori, Sebastian Hess, Fabrice Not, Charles Bachy, Andres Gutiérrez-Rodríguez, Mengyun Wang, Man Chen, Yingchun Gong, Kensuke Seto, Maiko Kagami, Yoko Hamamoto, Daisuke Honda, Takahiro Umetani, Akira Shihongi, Motoki Kayama, Toshiki Matsuda, Junya Taira, Akinori Yabuki, Masashi Tsuchiya,

- Yoshihisa Hirakawa, Akane Kawaguchi, Mami Nomura, Atsushi Nakamura, Noriaki Namba, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Rina Higuchi, Akihiro Yamamoto, Tadanobu Maruyama, Aika Yamaguchi, Akihiro Uzuka, Shin-ya Miyagisima, Jun Kawahara, Toshinobu Suzaki, Masami Nakazawa, Takahiro Ishikawa, Moe Maruyama, Goro Tanifuji, Masanobu Kawachi, Yusuke Kinoshita, and Hitoshi Tamiaki (2019) Taming chlorophylls by early eukaryotes underpinned algal interactions and the diversification of the eukaryotes on the oxygenated Earth. *The ISME journal* (accepted) ( 査読有 )
4. Christian Wurzbacher, Ellen Larsson, Johan Bengtsson-Palme, Silke Van den Wyngaert, Sten Svantesson, Erik Kristiansson, Maiko Kagami, Henrik Nilsson (2019) Introducing ribosomal tandem repeat barcoding for fungi. *Molecular Ecology Resources* 19: 118-127. ( 査読有 )
  5. Yukiko Senga, Shiori Yabe, Takaki Nakamura, Maiko Kagami (2018) Influence of parasitic chytrids on the quantity and quality of algal dissolved organic matter (AOM). *Water Research* (145) 346-353. ( 査読有 )
  6. Silke Van den Wyngaert, Keilor Rojas-Jimenez, Kensuke Seto, Maiko Kagami, Hans-Peter Grossart (2018) Diversity and Hidden Host Specificity of Chytrids infecting Colonial Volvocacean Algae. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 65(6): 870-881. ( 査読有 )
  7. Peixue Song, Shoko Tanabe, Rong Yi, Maiko Kagami, Xin Liu, Syuhei Ban (2018) Fungal community structure at pelagic and littoral sites in Lake Biwa determined with high-throughput sequencing". *Limnology* (19)241-251. ( 査読有 )
  8. Thijs Frenken, Elisabet Alacid, Stella A Berger, Elizabeth C Bourne, Mélanie Gerphagnon, Hans-Peter Grossart, Alena S Gsell, Bas W Ibelings, Maiko Kagami, Frithjof C Küpper, Peter M Letcher, Adeline Loyau, Takeshi Miki, Jens C Nejstgaard, Serena Rasconi, Albert Reñé, Thomas Rohrlack, Keilor Rojas-Jimenez, Dirk S Schmeller, Bettina Scholz, Kensuke Seto, Télésphore Sime-Ngando, Assaf Sukenik, Dedmer B Van de Waal, Silke Van den Wyngaert, Ellen Van Donk, Justyna Wolinska, Christian Wurzbacher, Ramsy Agha (2017) Integrating chytrid fungal parasites into plankton ecology. Research gaps and needs. *Environmental Microbiology* (19). ( 査読有 )
  9. Akemi Iwayama, Hisako Ogura, Yukio Hirama, Chun-Wei Chang, Chih-hao Hsieh, and Maiko Kagami\* (2017) Phytoplankton species abundance in Lake Inba (Japan) from 1986 to 2016. *Ecological Research* (32) 783-783. ( 査読有 )
  10. Silke van den Wyngaert, Kensuke Seto, Keilor Rojas-Jimenez, Maiko Kagami, Hans-Peter Grossart (2017) A new parasitic chytrid, *Staustromyces oculus* (Rhizophydiales, Staustromycetaceae fam. nov.), infecting the freshwater desmid *Stauastrum* sp.. *Protist* (168)392-407. ( 査読有 )
  11. Maiko Kagami, Yasumichi Motoki, Hélène Masclaux, Alexandre Bec (2017) Carbon and nutrients of indigestible pollen are transferred to zooplankton by chytrid fungi. *Freshwater Biology* (62) 954-964. 10.1111/fwb.1291 ( 査読有 )
  12. Kimiyo Matsukura, Dai Hirose, Maiko Kagami, Takashi Osono, Yuichi Yamaoka (2016) Geographical distributions of rhytismataceous fungi on *Camellia japonica* leaf litter in Japan. *Fungal Ecology* (26) 37-44. 10.1016/j.funeco.2016.11.006 ( 査読有 )

13. Kensuke Seto, Maiko Kagami, Yosuke Degawa (2016) Phylogenetic Position of Parasitic Chytrids on Diatoms: Characterization of a Novel Clade in Chytridiomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (64) 383-393. (査読有)
14. Michelle Maier, Kimiko Uchii, Tawnya Peterson, and Maiko Kagami\* (2016) Evaluation of Daphnid Grazing on Microscopic Zoospore Fungi using Comparative CT qPCR. *Applied and Environmental Microbiology* 82(13) 3868-3874. (\*corresponding author) (査読有)
15. Hans-Peter Grossart, Christian Wurzbacher, Timothy James, Maiko Kagami (2016) Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoospore fungi. *Fungal Ecology* 19: 28-38. (査読有)

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 鏡味麻衣子「Dark matter fungi: 様々な時空間スケールで水生菌類の機能的多様性をとらえる」(シンポジウム: 群集生態学のこれまでとこれからでの招待講演) 日本生態学会第 66 回全国大会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2019 年 3 月 16 日
2. 鏡味麻衣子「Dark matter fungi: 水生菌類の多様性と機能(招待講演)」北海道大学低温科学研究所研究集会「水環境の保全と再生に向けた環境微生物学・水環境学の最前線」、北海道大学低温科学研究所(北海道札幌市)、2018 年 11 月 9 日
3. 鏡味麻衣子「Mycoloop の先へ、これから挑戦したいこと」日本陸水学会第 83 回大会 自由集会「若手の会: ライトニングトーク」岡山大学(岡山県岡山市)、2018 年 10 月 5 日
4. Maiko Kagami「Epidemic dynamics of chytrids in aquatic food webs (招待講演)」3rd plankton chytridiomycosis workshop、Wageningen (The Netherlands)、2018 年 9 月 5-7 日
5. Maiko Kagami, Silke van den Wyngaert, Kensuke Seto, Christian Wurzbacher, Hans-Peter Grossart「Single spore analysis reveals diverse host-parasite relationships between phytoplankton and fungi」日本微生物生態学会第 32 回大会、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)、2018 年 7 月 13 日
6. Maiko Kagami「Diversity and functions of parasitic fungi in aquatic ecosystems (招待講演)」Marine Fungi Workshop、Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA (USA)、2018 年 5 月 7-9 日
7. 鏡味麻衣子、瀬戸健介、三木健「感染症と生態系機能: 生物多様性および食物網を考慮に入れたプランクトン感染症動態」(シンポジウム: Ecological Epidemiology(えこえび)の展開; データドリブンモデリングでの招待講演)、日本生態学会第 65 回全国大会(招待講演)、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018 年 3 月 16 日
8. 鏡味麻衣子、千賀有希子、Jason Woodhouse, Christian Wurzbacher, Hans-Peter Grossart「珪藻寄生性菌類がバクテリア群集構造および DOM 組成に与える影響」日本陸水学会第 8 回大会、駒ヶ岳グランドホテル(仙北市)、2017 年 9 月 30 日
9. Maiko Kagami, Yukiko Senga, Jason Woodhouse, Christian Wurzbacher, Hans-Peter Grossart「Parasitic fungi modulate algal-bacterial interactions and DOM composition」SAME 15 (15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology)、Zagreb (Croatia)、2017 年 9 月 5 日
10. Maiko Kagami「Diversity and functions of parasitic fungi in lakes and oceans」NIOO (Netherlands Institute of Ecology) seminar (招待講演) Wageningen (The Netherlands)、2017 年 3 月 6 日
11. Maiko Kagami, Kensuke Seto, Christian Wurzbacher, Takaki Nakamura, Daiki Nozaki, Silke van den Wyngaert, Keiloor Rojas, Hans-Peter Grossart「Generalist v.s. Specialist chytrids: Trade-off



between host specificity and ecological traits」2nd plankton chytridiomycosis workshop (招待講演)、Skagastrond (Iceland), 2016年9月15日

12. Maiko Kagami, Daiki Nozaki, Kensuke Seto, Takaki Nakamura, Christian Wurzbacher 「Single spore analysis reveals diversity and host specificity of parasitic fungi infecting phytoplankton.」SIL (International Society of Limnology) 2016、Torino, Italy, 2016.8.1

〔図書〕(計 1 件)

鏡味麻衣子監修 ときめく微生物図鑑 山と溪谷社 2016年8月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

横浜国立大学水域生態学研究室

<https://makagami.wixsite.com/mycoloop>

## 6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

ローマ字氏名：GROSSART, Hans-Peter

所属研究機関名：Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB-Berlin)

職名：Professor

ローマ字氏名：VAN DONK, Ellen

所属研究機関名：Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW)

職名：Professor