

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19710015

研究課題名（和文） 病原菌の駆動する湖沼物質流の定量化

研究課題名（英文） Quantifying material flows mediated by parasites in lake

研究代表者 鏡味 麻衣子 (KAGAMI MAIKO)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：20449250

研究成果の概要（和文）：

水生生物の主要な病原菌のひとつであるツボカビを対象に、DNA マーカーや蛍光染色法など最新技術を駆使し、野外における現存量・分布パターンの把握を試みた。印旛沼では常にツボカビが出現し、珪藻など様々な種類に寄生している様子が確認された。また、湖沼には多様な菌類が出現するが、その中でツボカビが最も多く出現している事が明らかとなった。ツボカビは植物プランクトンを殺すだけでなく、動物プランクトンの餌として物質流を駆動している事が確かめられた。

研究成果の概要（英文）：

Chytrids are one of the most dominant parasites in aquatic ecosystems. We investigated the dynamics of chytrids in lakes, by applying molecular techniques and fluorescence dying. In Lake inba, chytrids appeared throughout a year, infecting various phytoplankton species such as diatoms. Chytrids found to be dominant species among diverse fungi in lakes. Chytrids play important roles not only as parasites of phytoplankton but also as foods for zooplankton, mediating material flows in lakes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：生態学、印旛沼、ツボカビ、菌類、微生物、珪藻、DGGE、環境変動

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中において様々な感染症が蔓延・拡大し、人間生活を脅かしている。最近の話題となる感染症の多くは、エイズや鳥インフルエンザにみられるように、ウイルスが病原体である。一方、水生生物に関しては、ツボカビもまた主要な病原体の一つであり、魚・両生類・プランクトンなど多くの生物がツボカビに寄生され殺される。しかし、方法的制約からツボカビを扱った研究は未だ記載・観察にとどまっており、寄生メカニズム自体ほとんど解っていない。さらには物質循環や食物網動態といった生態系レベルでツボカビの影響を調べた研究例は皆無に等しい。

2. 研究の目的

本研究では、水生生物の主要な病原菌のひとつである寄生菌類（ツボカビ）に着目し、湖沼食物網におけるツボカビの役割を「自然湖沼」にて把握することを目指す。

(1) 蛍光染色および DNA マーカーを用いたツボカビの簡便検出法を確立する。

(2) 野外におけるツボカビの現存量・分布パターンを把握する。

(3) 培養実験によりツボカビを介した植物プランクトン→動物プランクトンの物質転換効率を定量化する。

3. 研究の方法

(1) ツボカビ検出法の確立

ツボカビを直接観察する方法として、蛍光染色および微分干渉装置を用いた観察方法の確立を試みた。真菌類の 18SrRNA をターゲットにした DGGE 法（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）およびクローンライブラリー法がツボカビへ適用が可能であるかを検討した。方法の検討は培養しているツボカビを用いて行くと同時に、印旛沼など野外試料に

ついても検討した。

(2) ツボカビの現存量・分布パターン

ツボカビの現存量、特に植物プランクトンへの寄生率の変動パターンや遊走子の密度を野外において定量化する事を試みた。千葉県が保存している印旛沼のプランクトン試料（千葉県環境生活部水質保全課）を検鏡することで、2006 年から 2009 年の 4 年間についてツボカビの寄生率と遊走子の密度を計数した。DGGE 法とクローンライブラリー法を用いて、印旛沼での菌類群集およびツボカビの出現パターンについて解析した。

(3) ツボカビを介した物質転換効率

培養実験を行い、植物プランクトン→ツボカビ→動物プランクトンの物質転換効率について検討した。ツボカビとその捕食者となりうる動物プランクトンの関係について、両者の野外での出現時期をもとに検討した。

4. 研究成果

(1) ツボカビ検出法の確立

印旛沼や霞ヶ浦、十和田湖の野外試料を用いてツボカビを検出する方法を検討した。ツボカビ胞子体のもつキチン質を Calcofluor White で染色し、蛍光顕微鏡下(UV)で観察することで、ツボカビではない生物との区別が簡単につけられた。ツボカビの有無を判定するには、試料をプランクトンネットで濃縮した後、寄主となる植物プランクトンについている状態（胞子体）で観察するのが最も確実に効率がよいことが明らかとなった。さらに、微分干渉装置を用いて鮮明に観察するシステムを確立した。

真菌類の 18SrRNA をターゲットにした DGGE 法（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）の適用可能性について培養しているツボカビと野外試料を用いて検討した結果、特定の

プライマーセットを用いれば可能であることが明らかとなった。同様のプライマーセットを用いてクローンライブラリー法も行うことも可能であった。

(2)ツボカビの現存量・分布パタン

2006年度から2009年度までの印旛沼の試料について、珪藻 *Aulacoseira granulata* および *A. ambigua* に対するツボカビの寄生率を計数した。珪藻2種への寄生率は共に5月に最も高くなったが、最高でも15%未満と低く抑えられている事が明らかとなった。一方、ツボカビの1ml中の密度は孢子体としては約1800、遊走子としては18000から36000存在すると推定され、その密度は鞭毛虫など原生生物の密度を上回るほど多いことが浮かび上がってきた。印旛沼において、ツボカビは珪藻の個体群動態を強く制御するほどではないが、動物プランクトンなどの重要な餌源になっているのかもしれない。

印旛沼において週1回の野外調査を行った結果、優占している珪藻 *Aulacoseira granulata* 上に2種類のツボカビが寄生していることが確認された。また別種の *Aulacoseira ambigua* にも2種のツボカビが寄生している様子が認められた。さらに、緑藻類の *Pediastrum* や *Scenedesmus* といった稀に出現する種にもツボカビが寄生している事が確認された。形態から同一種のツボカビが複数種の植物プランクトンに寄生しているのではないかと考えられた。分子生物学的手法(DGGE法、クローンライブラリー法)により約10種類のツボカビが検出された。そのうち植物プランクトンに寄生すると考えられるツボカビは2種認められ、*Chytridium* sp. であると推察された。これら2種が複数種の植物プランクトンに寄生しているのかもしれない。一方、他8種のツボカビについては、分解性の種

類と近縁であったが、詳しい生態については明らかにはならなかった。

(3)ツボカビを介した物質転換効率

珪藻 *Asterionella formosa* を餌にケンミジンコを培養したところ、珪藻だけではすぐに全滅してしまうが、ツボカビがいるとケンミジンコの生存率が維持されることが明らかとなった。

印旛沼においてツボカビを捕食しうるオナガミジンコやケンミジンコなど動物プランクトンも多く観察された。植物プランクトンの中でも優占している珪藻はツボカビに寄生されること、ツボカビの1ml中の密度は遊走子としては18000から36000存在すると推定されることをふまえると、印旛沼において大型珪藻—ツボカビ—オナガミジンコという食物連鎖が重要な物質流になっている可能性が浮かび上がってきた。

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7件)

- ① Maiko Kagami, Nico Helmsing, Ellen van Donk (2010) Parasitic chytrids could promote copepod survival by mediating material transfer from inedible diatoms. *Hydrobiologia* (in press). 査読有
- ② Emilie Lefevre, Marlene Jobard, Jean-Stéphane Venisse, Alexandre Bec, Maiko Kagami, Christian Amblard, Télésphore Sime-Ngando (2010) Development of a Real-Time PCR assay for quantitative assessment of uncultured freshwater zoosporic fungi. *Journal of Microbiological Methods* 81: 69-76. 査読有

- ③ 鏡味麻衣子 (2008) 宮地賞受賞者総説 ツボカビを考慮に入れた湖沼食物網の解析. 日本生態学会誌 58 : 71-80 査読有
- ④ Frank H. Gleason, Maiko Kagami, Emilie Lefevre, Telesphore Sime-Ngando (2008) The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology Review* 22: 17-25. 査読有
- ⑤ Arnout de Bruin, Bas W. Ibelings, Maiko Kagami, Wolf Mooij and Ellen Van Donk (2008) Adaptation of the fungal parasite *Zygorhizidium planktonicum* during 200 generations of growth on homogeneous and heterogeneous populations of its host, the diatom *Asterionella formosa*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55(2):69-74. 査読有
- ⑥ Maiko Kagami, Eric von Elert, Bas W. Ibelings, Arnout de Bruin, Ellen Van Donk (2007) The parasitic chytrid, *Zygorhizidium* facilitates the growth of the cladoceran zooplankton, *Daphnia* in cultures of the inedible alga, *Asterionella*. *Proceedings of the Royal Society B*. 274:1561-1566. 査読有
- ⑦ Gaku Takimoto, Takeshi Miki and Maiko Kagami (2007) Intraguild predation promotes complex alternative states along a productivity gradient. *Theoretical Population Biology* 72:264-273. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 鏡味麻衣子、広瀬大. 日本生態学会企画集会：微生物生態学者から学ぶ方法論—分子生物学的解析法の適用可能性と限界—. 日本生態学会. 東大駒場、2010年3月18日
- ② Maiko Kagami (招待講演) Ecology of chytrids in aquatic ecosystem. Asian Mycological Congress & International Marine and Freshwater Mycology Symposium. 台湾、台中市、2009年11月18日
- ③ 鏡味麻衣子、石井伸昌、早川雅久、小倉久

- 子. 印旛沼における植物プランクトンと寄生性ツボカビの動態. 第74回日本陸水学会. 大分県大分市、2009年9月20日
- ④ Maiko Kagami (招待講演) Parasitic chytrids as a food source for zooplankton. Microorganism seminar: Genome & Environment. フランス、クレルモンフェラン市、2009年6月18日
- ⑤ 鏡味麻衣子、Ellen Van Donk. 病原菌ツボカビを介した動物—植物プランクトン相互関係. 第56回日本生態学会. 岩手県盛岡市、2009年3月21日
- ⑥ 天野陽介、鏡味麻衣子、石井伸昌. 印旛沼におけるツボカビを含めた真菌類の検出. 第56回日本生態学会. 岩手県盛岡市、2009年3月19日 (ポスター優秀賞を受賞)
- ⑦ 鏡味麻衣子 (招待講演) ミジンコはツボカビがお好き? ツボカビを考慮に入れた湖沼食物網動態の解析. 北海道若手生態研究会. 北海道札幌市、2009年3月1日
- ⑧ 鏡味麻衣子 (宮地賞受賞講演) ツボカビを考慮に入れた湖沼食物網動態の解析. 第55回日本生態学会. 福岡県福岡市、2008年3月16日
- ⑨ 鏡味麻衣子 (招待講演) ツボカビを考慮に入れた湖沼食物網動態の解析. 日本陸水学会東海支部会. 静岡県浜松市、2008年2月23日
- ⑩ 鏡味麻衣子、Ellen Van Donk, Bas W. Ibelings, Eric von Elert. ミジンコはツボカビがお好き!? 第72回日本生態学会. 茨城県水戸市、2007年9月13日
- ⑪ Maiko Kagami, Ellen Van Donk, Arnout de Bruin, Eric von Elert, Bas W. Ibelings. Parasitic chytrid of phytoplankton facilitate the growth of zooplankton. 第30回国際理論応用陸水学会(SIL). カナダ、モントリオール市、2007年8月18日
- ⑫ Maiko Kagami, Ellen Van Donk, Arnout de Bruin, Eric von Elert, Bas W. Ibelings. Parasitic fungi may bridge the gap between inedible algae and zooplankton. International zooplankton production symposium. 広島県広島市、2007年5月31日

[図書] (計 1 件)

- ① 湖と池の生物学—生物の適応から群集理論・保全まで—: 占部城太郎監訳、占部城太郎、吉田丈人、鏡味麻衣子、石川俊之、岩田智也共訳 2007年9月(共立出版)総339ページ The Biology of Lakes and Ponds (second edition) Christer Bro'nmark & Lars-Anders Hansson, Oxford University Press, 2004.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/env/kagami/>

メディア掲載 (計 5 件)

- ① 2010 年 4 月号 子供の科学「GoGo!ミルボ」
- ② 2009 年 5 月 11 日 朝日新聞「ひと：ツボカビの専門家：鏡味麻衣子」
- ③ 2009 年 4 月 4 日 船橋よみうり「真菌類の検出でポスター賞：天野陽介」
- ④ 2007 年 10 月 6 日 NHK サイエンスゼロ「カエルツボカビの最新情報」
- ⑤ 2007 年 4 月 29 日 読売新聞「ツボカビ症の抑制、ミジンコが効果？」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鏡味 麻衣子 (KAGAMI MAIKO)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：20449250