

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03033

研究課題名(和文) 海洋における菌類様原生生物の分布と生態系・有機物動態への寄与

研究課題名(英文) Contribution of fungoid protists Labyrinthulomycetes to planktonic food webs and biogeochemical cycles in marine ecosystem

研究代表者

大林 由美子 (Obayashi, Yumiko)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師

研究者番号：60380284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,600,000円

研究成果の概要(和文)：海洋の物質循環のなかで、海水中での有機物の分解・分子変換に関しては、従属栄養細菌群集以外についての情報は少なく、真核微生物の寄与はよくわかっていない。本研究は、吸収栄養性の単細胞真核微生物である菌類様原生生物ラビリンチュラ類に注目し、海洋漂泳区での有機物分解・変換の担い手としてのそれらの寄与の可能性と、生態系のなかでのその位置づけを探った。その結果、ラビリンチュラ類の高い有機物分解能とその特徴が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌類様原生生物ラビリンチュラ類は、沿岸で落ち葉などの分解者として知られてきたが、落ち葉などのない外洋も含めて世界中の海に存在することが示唆されている。本研究ではラビリンチュラ類が海水中の生物由来高分子有機物を分解・変換する能力とその特徴を示した。このことは、海洋漂泳区での有機物の動態における菌類様原生生物の寄与を示唆し、海洋物質循環における有機物の分解・分子変換プロセスに新たな視点を与えた。

研究成果の概要(英文)：In marine biogeochemical cycles, organic matter degradation has been thought to be attributed by heterotrophic bacteria, and the contribution of eukaryotic microorganisms is not well considered. In this study, we focused on the fungoid protists Labyrinthulomycetes, the osmotrophic unicellular eukaryotic microorganisms. We explored their potential activity of extracellular hydrolysis of polymeric organic matter in seawater and their position in the marine planktonic ecosystem. As a result, the high potential of organic matter degradation in seawater by Labyrinthulomycetes and the characteristics of each phylogenetic group were shown.

研究分野：生物地球化学，水圏微生物生態学，微生物海洋学

キーワード：海洋生態系 有機物分解 細胞外加水分解酵素 微生物群集 原生生物 ラビリンチュラ類 動物プランクトン 消化管内容物 メタバーコーディング解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上の一次生産の約半分は海洋で行われている。生産された有機物は、生態系のなかで形を変えながら移動する。海洋漂泳区ではその主たる移動・変換経路として、「植物プランクトン動物プランクトン 魚などの高次栄養生物」という捕食食物連鎖に加え、生産された有機物が何らかの過程を経て海水中の“溶存有機物”となり、これが海水中の従属栄養細菌に取り込まれたのちに捕食の経路へと繋がっていく「微生物ループ」と呼ばれる経路があることが認識されている。また、生物の遺骸や糞などは“デトリタス有機物”と呼ばれ、沈降速度の大きな粒子は下層への有機物輸送に貢献するが、それらの多くも途中で生物の作用による物質変換・分解の経路を経て再び一次生産の材料となる。

海洋では、“溶存有機物”や“デトリタス有機物”といった非生物態有機物の分解・変換の担い手は、主として原核微生物である従属栄養細菌と考えられている。従属栄養細菌以外の分解者として、海洋でも菌類(カビ)の存在は確認されており、沿岸湧昇域や北極海の氷床付近などいくつかの海域では菌類の高い生物量と有機物分解への寄与についての報告がある。もう一つ、菌類とは全く異なる生物でありながら、菌類のように吸収栄養性で生物遺骸などを栄養源とする真核の微生物として、ラビリンチュラ類などの菌類様原生生物がある。

ラビリンチュラ類は、直径 2~20 μm 程度の単細胞真核微生物で、河口域やマングローブ域では水に落ちた葉などを分解して吸収栄養源とする分解者として知られてきた。微生物群集解析における分子生物学的手法の普及に伴い、海水中の真核微生物群集についてメタバーコーディング法による網羅的解析が行われるようになり、ラビリンチュラ類が、落ち葉などのない外洋を含め、世界中の海に普遍的に存在することが示唆されるようになった。しかし、海洋漂泳区での有機物分解や食物連鎖におけるラビリンチュラ類(菌類様原生生物)の寄与・位置づけに関する情報は少なく、その実態はよくわかっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、海洋漂泳区生態系での有機物の移動・変換・分解過程における菌類様原生生物ラビリンチュラ類の寄与・位置づけに関する情報を得ることを目的とした。なお、菌類様原生生物とは本来ラビリンチュラ類だけを表す言葉ではないが、Tara Oceans で公表されている結果などから、海洋漂泳区の吸収栄養性・腐食性の原生生物はラビリンチュラ類に代表されると考えられるため、本研究ではそのように位置づけた。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリー (FCM) を用いたラビリンチュラ類 (ヤブレッツボカビ類) 定量法の検討

海洋漂泳区での物質循環における菌類様原生生物の寄与を定量的に評価するには、海水中的でのその現存量の把握が必要となる。そのためには、多くの試料を取り扱える迅速かつ信頼性の高い方法で海水中のラビリンチュラ類の定量を行うことが望まれる。従来蛍光顕微鏡下でのラビリンチュラ類の検出・計数に用いられているアクリフラビン染色法に、フローサイトメトリー (FCM) を組み合わせた方法が Duan *et al.* (2018) で用いられている。しかし、この先行研究においては、その方法の検証に *Aurantiochytrium* 属の株のみが用いられており、他の系統群では行われていない。そこで、ラビリンチュラ類のなかで海洋漂泳区での存在が期待されるヤブレッツボカビ科およびアプラノキトリウム科の計 11 株 (*Aurantiochytrium* 属、*Schizochytrium* 属、*Oblongichytrium* 属、*Sicyoidochytrium* 属、*Parietichytrium* 属、*Ulkenia* 属、*Botryochytrium* 属、新規系統群 (NGC1)、*Thraustochytrium* 属 HK8 クレード、*Thraustochytrium aureum*、*Aplanochytrium* 属より各 1 株) でそれぞれ対数増殖期と定常期の培養液について、アクリフラビン染色と FCM を用いた計数の信頼性・再現性を検討した。この際、大きさが同程度でラビリンチュラ類ではない細胞として海産酵母を対照に用いた。FCM に供したものと同じ試料を用いて、蛍光顕微鏡下での直接計数も行い、計数値を比較した。

(2) 菌類様原生生物の細胞外有機物分解能：ラビリンチュラ類の細胞外プロテアーゼ

水中での生物由来有機物の分解・分子変換に対するラビリンチュラ類の関与の可能性を知るため、液体培地中でラビリンチュラ類の細胞外有機物分解能を調べた。具体的には、ラビリンチュラ類のなかのヤブレッツボカビ類 10 系統群から計 17 株について、液体培地中で培養し、対数増殖期の細胞を含む培養液とその細胞を除いた培養上清、定常期に達した細胞を人工海水に移して 2 日間おいた細胞懸濁液とその細胞を除いた上清のそれぞれで、17 種類のオリゴペプチド MCA 基質 (アミノペプチダーゼ用 5 種、トリプシン用 10 種、キモトリプシン用 2 種) の分解活性を測定して各株の細胞外プロテアーゼ活性プロファイルとし、解析した。

(3) ラビリンチュラ類捕食者の探索と、新規菌類様原生生物の探索

海洋漂泳区生態系でのラビリンチュラ類の捕食者の探索に向け、比較的小型の動物プランク

トンである枝角類の消化管内容物について 18S rRNA 遺伝子を用いたメタバーコーディング解析を試みた。対象遺伝子領域を PCR で増幅する際には、枝角類遺伝子の増幅は阻害されるよう PNA を添加して実施した。

海水中の吸収栄養性の従属栄養真核微生物についての情報をより広く集めるため、馬血清入り改変培地を用いて海水から新たな真核微生物株の分離と分離株の系統解析等を行った。

4. 研究成果

(1) FCM を用いたラビリンチュラ類（ヤブレッツボカビ類）定量法の検討

アクリフラビン染色により、生物の細胞質は緑色蛍光で、ラビリンチュラ類に特異的な硫酸多糖類からなる細胞外皮は赤色蛍光で観察されることから、FCM では、赤色蛍光 (FL4) / 緑色蛍光 (FL2) サイトグラム上でラビリンチュラ類（ヤブレッツボカビ類）細胞を判別、計数した。検討に用いた 11 系統群の株は、いずれも単独での検出・計数は可能であった。しかし、アクリフラビン染色による赤色蛍光の強度が株によって異なり、また同じ株の対数増殖期と定常期でも異なっていた。多くの場合、FL4/FL2 サイトグラム上で、対照として用いた（硫酸多糖の外皮をもたない）酵母細胞と区別可能であったが、*Aurantiochytrium* 属株の定常期、新規系統群 NGC1 と *Thraustochytrium* 属 HK8 クレートの対数増殖期および定常期においては赤色蛍光強度が低く、酵母細胞との区別ができなかった。FCM で得られた計数値と蛍光顕微鏡下での直接計数値との比較では、系統群および成長段階（対数増殖期、定常期）によって大小関係が異なった。FCM 計数値は直接計数値に比して最小で 23%（約 4 分の 1）から最大で 278%（約 2.8 倍）となり、両計数値は必ずしも一致はしていないが、一桁を超えるような相違はなかった。

本研究により FCM を用いたラビリンチュラ類の定量の可能性を示すことはできたが、実際の海洋環境で様々な種類・成長段階のラビリンチュラ類が他の多くの種類の原生生物と混在している状況でのラビリンチュラ類の現存量評価において、信頼性・再現性を明示した定量的表現を実現するには、さらに検討および工夫が必要であると考えられた。

(2) 菌類様原生生物の細胞外有機物分解能：ラビリンチュラ類の細胞外プロテアーゼ

調べたすべてのラビリンチュラ株で、対数増殖期にも定常期にも、アミノペプチダーゼ型およびトリプシン型の細胞外プロテアーゼ活性が認められた。キモトリプシン型活性を持つ株は限られていた。同属の株同士では比較的似たプロファイルが見られ、属間では異なっていたことから、系統群により分解しやすい有機物が異なる可能性が示唆された(図 1)。対数増殖期には、アミノペプチダーゼ活性はいずれの株でもほとんどが細胞画分にあり、トリプシン型活性は、20%から 93%が上清画分にあった。すなわち、対数増殖中のラビリンチュラ類は、アミノペプチダーゼを細胞表面のエクトエンザイムとして持つ一方、トリプシン型酵素の一部を水中に放出していると考えられる。定常期には、多くの株で、対数期よりも上清画分の活性の割合が高くなる傾向があった。定常期の株は貧栄養環境においており、貧栄養下では使える有機物を求めて周辺水中へ放出する酵素の率が高くなるのかもしれない。また、対数増殖期・定常期のトリプシン型の放出率の特徴により、使用した 17 株は 3 つのタイプに分けられた。このタイプ分けは、それぞれの株の分離源の特徴による仕分けとも共通していたことから、細胞外有機物分解能の特徴と、その系統群が生息しやすい環境にはなんらかの関係があることが推察された。

以上より、ラビリンチュラ類は、栄養豊富で活発に増殖している状況においても、貧栄養で定常的な状況においても、海水中有機物分解・分子変換に貢献していることがわかった。

(3) 生態系・食物連鎖の中での位置づけ

駿河湾で夏季に採集した枝角類 2 種の消化管および同時に採取した海水を濾過したフィルターで行ったメタバーコーディング解析では、いずれもラビリンチュラ類の寄与があまり見られ

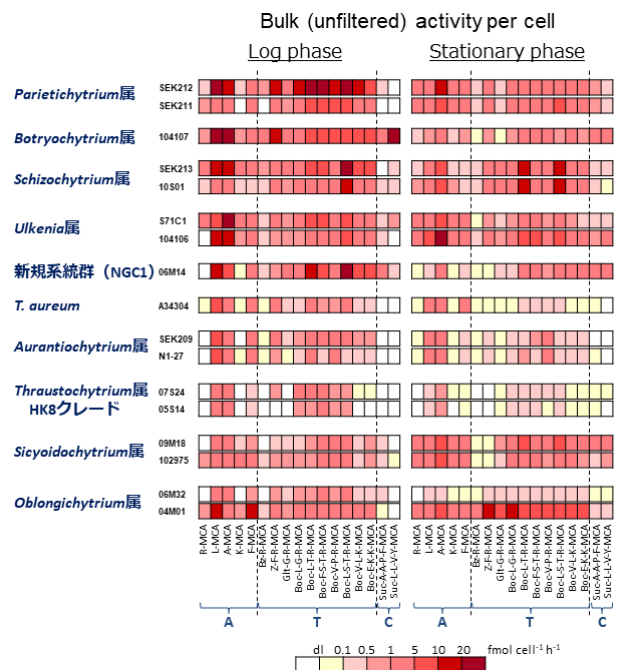


図 1. ラビリンチュラ類（ヤブレッツボカビ科）10 系統群 17 株の培養液中の対数増殖期（左）と定常期（右）の細胞外プロテアーゼ活性プロファイル。細胞を含む未濾過の培養液におけるアミノペプチダーゼ用基質 (A) 5 種、トリプシン用基質 (T) 10 種、キモトリプシン用基質 (C) 2 種の分解活性で表している。

ず、動物プランクトンの餌料としてのラビリントウ類の寄与の大きさは評価できなかった。しかし、今後このような解析の範囲を広げていくことで、漂泳区生態系での菌類様原生生物の位置づけの理解に繋がる情報が得られると考えられる。

改変培地を用いて駿河湾沖合域の海水から多様な微生物の分離を試みた結果、複数種類の吸収栄養性真核微生物の分離・株化に成功した。分離した微生物の一部は新種とみられた。これらの新規分離微生物の詳細を調べることで今後新たな情報が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenmochi Akiyuki, Takahashi Daisuke, Matsuura Hiroyuki, Yoshikawa Takashi, Sohrin Rumi, Obayashi Yumiko, Kuroda Hiroshi, Nishikawa Jun	4. 巻 79
2. 論文標題 Cladoceran communities in offshore Suruga Bay, Japan: How are they formed?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oceanography	6. 最初と最後の頁 49-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10872-022-00662-5	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 Yoshikawa Takashi, Sohrin Rumi, Obayashi Yumiko, Matsuura Hiroyuki, Nishikawa Jun, Hayashizaki Kenichi	4. 巻 77
2. 論文標題 Seasonal and vertical variations in phytoplankton photosynthetic parameters and primary production in Suruga Bay, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oceanography	6. 最初と最後の頁 797-818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10872-021-00610-9	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 Kenmochi Akiyuki, Matsuura Hiroyuki, Yoshikawa Takashi, Sohrin Rumi, Obayashi Yumiko, Nishikawa Jun	4. 巻 17
2. 論文標題 Seasonal abundance of marine cladocerans in the offshore waters of Suruga Bay, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 57-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3800/pbr.17.57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yumiko Obayashi, Satoru Suzuki	4. 巻 14
2. 論文標題 High growth potential of transiently 0.2- μ m-filterable bacteria with extracellular protease activity in coastal seawater	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 276-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3800/pbr.14.276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 剣持瑛行・平井惇也・吉川尚・大林由美子・西川 淳
2. 発表標題 駿河湾沖合域に大量出現する海産枝角類の食物網における役割：安定同位体比解析とメタバーコーディング食性解析によるアプローチ
3. 学会等名 2022年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高尾祥丈・山本哲史・中村兼蔵・和田良太・大林由美子
2. 発表標題 両極性ラビリンチュラAmphifilidae科の原生生物の分離
3. 学会等名 第7回ラビリンチュラシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宗林留美・西山貴博・西川 淳・松浦弘行・吉川 尚・大林由美子・兎玉武稔
2. 発表標題 駿河湾における栄養塩の窒素：リン比の季節変化とその生物学的要因
3. 学会等名 2020年度日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宗林留美・高野勇知・茂木 篤・峰澤卓巳・西川 淳・松浦弘行・吉川 尚・大林由美子
2. 発表標題 駿河湾沖合部における微生物群集の時空間分布
3. 学会等名 2021年度日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相田奈々・池上 輝・吉川 尚・宗林留美・大林由美子・松浦弘行・西川 淳
2. 発表標題 駿河湾における植物プランクトン群集構造の季節変動
3. 学会等名 2021年度日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹彬憲・藤井千早・大林由美子・高尾祥丈
2. 発表標題 新規アセトスポラ原生物が持つミトコンドリアRNA編集
3. 学会等名 日本共生生物学会 第5回大会 (Symbio2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumiko Obayashi
2. 発表標題 Microbes and biogeochemical cycles in marine ecosystem
3. 学会等名 International Symposium "Usable Science Resulting in Impact Series II (Theme: Biodiversity)" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大林由美子・高尾祥丈
2. 発表標題 菌類様原生物ラビリントラ類の細胞外プロテアーゼ
3. 学会等名 2019年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 剣持瑛行・松浦弘行・吉川 尚・宗林留美・大林由美子・西川 淳
2. 発表標題 駿河湾沖合域および折戸湾における海産枝角類の個体群動態
3. 学会等名 2019年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Obayashi Y, Suzuki S, Hamasaki K
2. 発表標題 Responses of bacterial communities and extracellular enzyme activities to addition of protein or free amino acids in the subtropical and subarctic North Pacific
3. 学会等名 PICES-2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenmochi A, Takayanagi K, Matsuura H, Yoshikawa T, Sohrin R, Obayashi Y, Nishikawa J
2. 発表標題 Mass occurrence and its ecological significance of marine cladocerans in offshore Suruga Bay, Japan
3. 学会等名 4th Asian Marine Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	高尾 祥丈 (Takao Yoshitake) (00511304)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授 (23401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	宗林 留美 (福田留美) (Sohrin Rumi) (00343195)	静岡大学・理学部・准教授 (13801)	
研究分担者	吉川 尚 (Yoshikawa Takashi) (80399104)	東海大学・海洋学部・教授 (32644)	
研究分担者	松浦 弘行 (Matsuura Hiroyuki) (50459484)	東海大学・海洋学部・准教授 (32644)	
研究分担者	西川 淳 (Nishikawa Jun) (10282732)	東海大学・海洋学部・教授 (32644)	

	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
研究協力者	平井 惇也 (Hirai Junya) (30762554)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	
研究協力者	剣持 瑛行 (Kenmochi Akiyuki) (32644)	東海大学・大学院生物科学研究科・大学院生 (32644)	

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