

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580239

研究課題名（和文）海産有毒プランクトンに寄生する真菌（ツボカビ）の分類と生態に関する研究

研究課題名（英文）Taxonomy and ecology of parasitic chytrid on toxic marine plankton

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

研究成果の概要（和文）：海洋における麻痺性貝毒の原因プランクトンであるアレキサンドリウムは生活史の一時期に休眠細胞を形成するが、それから発芽した細胞に寄生する菌類を発見した。その正体を明らかにするため、菌体、遊走子の微細構造およびリボソーム遺伝子を解析した。その結果、本菌はツボカビの一種であることが明らかとなった。本研究により、海産植物プランクトンに寄生するツボカビが初めて明らかになり、海洋生態系においても寄生性ツボカビが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：During the germination experiments of the cysts of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, we found that the germinated cells were infected by a kind of parasitic fungus. Purpose of this study was to identify the fungus by examining the morphology and the development with light and electron microscopes. Ultrastructure of the zoospore and rDNA sequences indicate that the fungus belong to Chytridiales. Our finding is the first report of fungal parasitism on the toxic marine dinoflagellate and suggests that chytrid fungus may play an important role in marine environment as in freshwater system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,450,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：菌類，ツボカビ，有毒プランクトン，寄生

1. 研究開始当初の背景

植物プランクトンは水圏の一次生産を支える重要な生産者であるが、一方で大量に発生して赤潮を形成し魚介類を斃死させ、ある

いは麻痺性毒などを生産することにより貝毒の原因にもなっている。従来、有害・有毒プランクトンの消滅は、主に動物プランクトンなどの捕食者による捕食と沈降によると

されてきたが、それらの多くが水柱中で死滅・消失していることが明らかになってきた。この捕食や沈降によらない死亡は、環境要因の悪化（栄養塩や光など）による生理的死亡と細菌、ウイルスなどによる寄生死亡とに大別されている。

これまで、海洋における有害・有毒プランクトンの寄生死亡に関与する微生物として、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が、菌類に関する知見はほとんどない。水産学上重要な海生菌類としては、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も知られるが、これらは系統的に真菌とは異なり、原生生物（クロミスタ界）に属する。さらに、珪藻類に寄生する真菌（ツボカビ）として *Rhizophyidium* 属など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、さらに海産渦鞭毛藻に寄生する真菌は全く知られていない。

我々は、有害・有毒プランクトンによるブルーム発生には休眠期細胞（シストなど）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、発芽直後の栄養細胞の多くに粒状の構造物が多数付着し、その細胞の葉緑体の色調が暗赤色からオレンジ色に変化していることをみとめた。形態的な状況から、これらの細胞はすでに死滅しているものと考えられたが、もしこの現象が実際に現場海域で起こっているならば、有毒プランクトンの初期個体群に非常に大きなインパクトを与えていると予想された。これまで、現場海域におけるシストの現存量と有毒プランクトンの発生量との間には、必ずしも明瞭な関係が認められない場合があったが、その要因の一つとして、真菌類の寄生による初期減耗が極めて重要な役割を果たしているものと考えた。事実、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。しかし、海洋における寄生性ツボカビの知見はほとんどない。

2. 研究の目的

我々はこれまで、有毒渦鞭毛藻アレキサンドリウム属の休眠期細胞（シスト）について、その休眠・発芽特性に関する研究を実施して

きた。その過程で、シストから発芽直後の栄養細胞に球形の孢子状粒子が付着・成長し、最終的には寄主細胞を死滅させることを見いだした。また、寄生細胞から遊走子と思われる遊泳細胞が大量に放出されることも判明した。寄生細胞は、その形態的な特徴から、淡水域で多数報告されているものと同じツボカビ門に属する真菌類の一種であると考えられた。海洋環境中における寄生性ツボカビの報告はほとんどなく、渦鞭毛藻に寄生する真菌の発見は、恐らくこれが世界で初めての事例である。一方、淡水域においては、ツボカビ類はその高い寄生性により、植物プランクトンや両生類（カエルなど）の動態を左右する大きな要因と考えられている。本研究では、海産プランクトンに寄生する新奇ツボカビの形態・分子分類、生活史を現場調査および室内実験（培養、光学・電子顕微鏡観察、遺伝子解析など）により解明し、これまでほとんど知見がなかった海洋生態系における寄生性ツボカビの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 現場調査による研究試料の収集

過去に有毒渦鞭毛藻アレキサンドリウムのブルームが発生した海域（三河湾、大阪湾など）において、エックマンおよび柱状採泥器による採泥を行い、シストを含む海底泥試料を得た。シストの分布密度は蛍光染色法によって直接計数を行い、以下の実験に有効なシスト密度が高い泥試料を特定した。

(2) 寄生性ツボカビの分離・培養法の検討

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、泥懸濁液を調製した。これを一定温度、明暗周期のもとで培養し、ほぼ毎日、光学顕微鏡観察を行って遊走子付着細胞の出現状況を把握した。遊走子付着細胞が見られた場合にはそれらを分離・培養し、その後の経過を観察した。

(3) 寄生性ツボカビの形態学的な検討

上記の培養の結果、寄生性菌類が認められた場合には、その菌体の特徴（形状、サイズ、色調、棘など修飾の有無、仮根）を把握した。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、核、ミトコンドリア、脂肪粒などの内部微細構造など）を明らかにした。ツボカビ門においては、とくに遊走子の微細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形態を精査した。

(4) 寄生性ツボカビの発達過程の観察

アレキサンドリウムのシストを多量に含

む海底泥から泥懸濁液を調製した。これを一定温度、明暗周期のもと培養した。培養開始後、毎日、泥懸濁液の一部を採取し、ブリン蛍光染色を行って、未発芽シスト、発芽直前のシスト、発芽細胞、および菌類の遊走子付着細胞、遊走子シスト、成熟遊走子嚢、および遊走子放出嚢の出現の経時変化を把握することにより、菌類の増殖過程（無性生殖）を明らかにした。また、既報の寒天培地などを用いて、菌類の継代培養を試み、培養が成功した場合には、増殖に及ぼす環境要因の影響および有性生殖過程や休眠細胞の有無など、生活史を調べた。また、当研究所で維持・培養を行っている各種の植物プランクトンと成熟した遊走子嚢を混合培養し、寄生の有無を調べることにより、菌類の寄主特異性を把握した。さらに、他海域から採取した海底泥試料に培養条件下で形成させ発芽可能（休眠解除）となったアレキサンドリウムのシストを混合して培養し、発芽細胞に対する菌類寄生の有無を調べることにより、種々の海域における寄生性菌類の分離を試みた。

(5) 寄生性ツボカビの分子系統解析

ツボカビの分子系統解析を行うため、データベースから他種菌類のリボソーム遺伝子（18S, 28S, ITS など）の塩基配列情報を入手し、PCR プライマーを設計した。CTAB 法等によるツボカビからの DNA 抽出法を確立した。得られたツボカビの菌体について DNA 抽出を行い、PCR 増幅後、rDNA の塩基配列を決定し、分子系統学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 寄生菌の菌体の形態学的特徴

アレキサンドリウムのシストを大量に含む海底泥を探索した結果、三河湾奥部において湿泥 1g あたり 3,000 個を超える高いシスト密度を含む試料を特定できた。

本試料から海底泥試料を調製・培養したところ、培養開始後 1 週間頃より有毒渦鞭毛藻のシストから発芽した細胞に遊走子と思われる小型粒子が付着しているのが観察され始めた。遊走子様細胞は数日のうちに成長し、細胞内部に小型の顆粒が認められるようになった。さらに成長が進むと、この菌体内部に遊走子と考えられる小型粒子が充満し、遊走子嚢となった。この際、細胞の内容がすべて遊走細胞となったことから、その形成は「全実性」であり、また、仮根が認められる場合があった。遊走子嚢は径約 20 μm の球状で、周囲には装飾物などの構造はみられなかった。その後、遊走子は遊走子嚢内で遊泳し始め、最終的には外部に放出された。放出管の形態は不明であったが、少なくとも蓋状の構造はみられず、無弁型と思われた（図 1）。

(2) 遊走子の外部形態と微細構造

遊走子は鞭毛とは逆方向に遊泳した。遊走

子は頭部が約 2 μm の球形で、後端に長さ約 16 μm のムチ型鞭毛 1 本を有した（図 2）。透過型電子顕微鏡観察の結果、遊走子は脂質粒子を 1 個持ち、マイクロボディ-脂質小球粒複合体 (MLC) と 1 個のミトコンドリアならびにリボソームが細胞中央にまとまって位置するが、核はそれとは一線を画するといった特徴を有することが明らかとなった（図 3）。これらの特徴を Barr (2001) の分類体系と比較した結果、本菌の遊走子の微細構造は 5 つのタイプのうちツボカビ目の特徴と一致することが判明した。

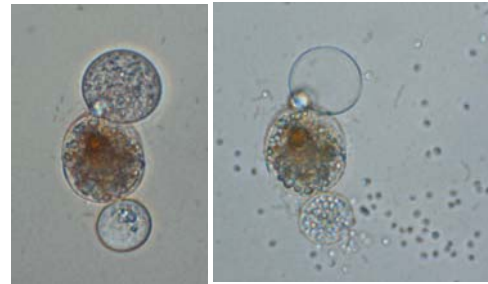


図 1. 寄生菌の菌体の外部形態。
左：培養開始後 43 時間，右：同 63 時間
中央は寄主細胞，上下は遊走子嚢。
63 時間後には遊走子が放出。

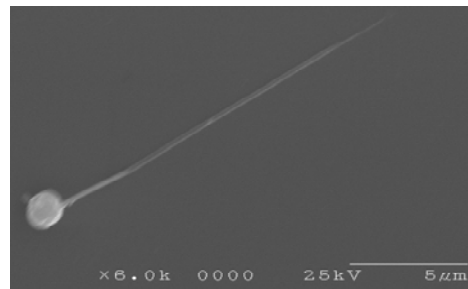


図 2. 遊走子の走査型電子顕微鏡写真

(3) 菌体の発達過程と培養

海底泥懸濁液を調製し、菌体の発達過程を経時的に調べた。アレキサンドリウムのシストからの発芽細胞は、培養開始後 2 日目から見られ始め、10 日目にその出現が最大となった後に減少した。遊走子が付着した寄主細胞は、8 日目から観察され、11 日目に急増してピークをむかえた後、減少した。成熟した遊走子嚢は 11 日目から見られ、出現頻度はその 2 日後に最大となった（図 4）。以上の経過から、ツボカビの生活史（遊走子の付着から新たな遊走子の放出まで）は、ほぼ 2 日間で完結するものと考えられた。透過電顕観察の結果、遊走子は寄主細胞に付着後、シスト化し、その一箇所から伸ばした仮根を寄主細胞に陥入することで発芽するものと思われた。

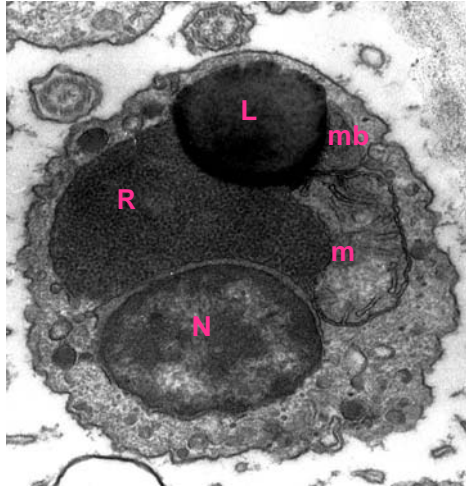


図3. 遊走子の透過電子顕微鏡写真.
L:脂質粒子, R:リボソーム, N:核
m:ミトコンドリア, mb:ミクロボディ

本菌の培養系を確立するため、三河湾菌の成熟した遊走子嚢を分離して PmTG 寒天培地に接種したが、培養は成功しなかった。一方、アレキサンドリウムの栄養細胞に直接接種した場合には寄生は成立しなかったが、栄養細胞を低温処理して調製したテンポラリーシスト状細胞に接種した場合には寄生が成立し、最大 24 日間、継代培養が可能であった。

また、珪藻類 4 種および 15°C 以下で培養可能な渦鞭毛藻（ヘテロカプサ属）の無菌株に成熟した遊走子嚢を添加して培養したが、いずれも寄生は成立せず、本菌の寄主特異性は非常に高いことが示唆された。

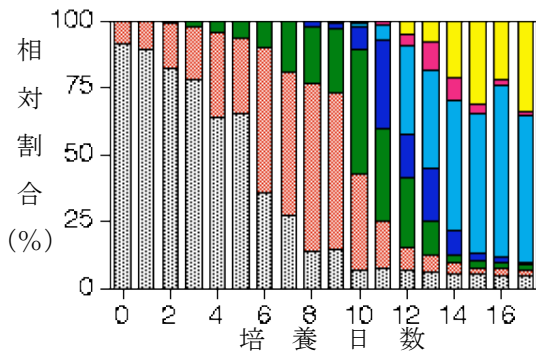


図4. 寄生菌の発達過程
グレー: 未発芽シスト, ピンク: 蛍光シスト
緑: 発芽細胞, 青: 遊走子付着細胞
コバルト: 遊走子発芽シスト,
マゼンタ: 成熟遊走子嚢
黄色: 空の遊走子嚢

(4) 分子系統解析

三河湾から得られた寄生性菌について、

18S および 28SrDNA の塩基配列を決定した。その結果と既存のデータベースから得られたツボカビの塩基配列を基に系統樹を作成した結果、本菌はツボカビの中でもフタナシツボカビ (*Rhizophyidium*) クレードに含まれることが明らかとなった。*Rhizophyidium* 属には淡水産珪藻 *Asterionella* に寄生する *R. planktonicum* が知られており、海産植物プランクトンの寄生菌が同じグループに属することが分かったことは大変興味深い。

これまで、海産のツボカビについては、干潟・マングローブ域において「腐食者」としての役割が指摘されているが、他生物に寄生するツボカビの研究は一部の大型藻類を除けば国内外を問わずほとんど実施されておらず、未解明の部分が非常に多く残されていた。しかし、今回我々は、これまで未知であった海産の寄生性ツボカビを発見し、その分類と増殖過程を明らかにすることができた。しかも今回、海底泥中で休眠しているシストからの発芽細胞に寄生するツボカビが見つかったことは、水柱のみならず、堆積物中でもツボカビの寄生が起こっていることを示すものであり、生態学的に意義が大きい発見であると考えられる。

本研究の成果は、海洋生態系における真菌類の役割の解明につながるばかりでなく、新たな宿主-寄生者の関係解析のためのモデルの提供、および有害・有毒プランクトンの生物学的制御の基礎となることが期待される。ごく最近、AFTOL 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、ネオカリマスティクス菌門、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。

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 3 件)

山口峰生, 小池香苗, 坂本節子, 海産有毒プランクトンに寄生するツボカビについて, 日本菌学会第 55 回大会, 2011 年 9 月 10 日, 北海道大学 (札幌)

Yamaguchi M, Koike K, Sakamoto S, Possible impact of parasitic chytrid on population dynamic of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, 14th International Conference on Harmful Algae, 2010 年 11 月 4 日, Creta & Terra Maris Convention Center

(ギリシヤ)

山口峰生, 坂本節子, 小池香苗, 山口晴生, 高野義人, 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* に寄生する菌類の発達過程と形態学的特徴, 2009年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 2009年10月18日, 北海道大学水産学部(函館)

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