

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02273

研究課題名(和文) 原生生物ラビリンチュラ類の食物網を介した魚類のDHA蓄積への影響力の解明

研究課題名(英文) Investigation of the influence of labyrinthulean protists on DHA accumulation in fish through the food web

研究代表者

本多 大輔 (Honda, Daiske)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：30322572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,630,000円

研究成果の概要(和文)：魚類のDHA(ドコサヘキサエン酸)は必須脂肪酸として食物連鎖を通して供給されているはずだが、その供給源となる生物は明確ではない。原生生物ラビリンチュラ類は、DHAを生合成することで知られている。特に研究代表者らは、ラビリンチュラ類の中でも、アプラノキトリウム類が生きている珪藻スケルトネマを捕食することを明らかにしたため、三陸沖での海洋生態系において、この系統群を中心としたラビリンチュラ類の現存量と多様性の把握と、DHAのカイアシへの蓄積量を試算した結果、渦鞭毛藻類や珪藻類といった他のDHA生産者よりも、大きな影響力を持っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DHAは我々ヒトにとっても脳や網膜などに含まれる有用な必須脂肪酸である。しかしながら、その魚類や動物プランクトンのカイアシなども、その生合成系をもたないことから、DHAを生産する供給者は植物プランクトンであるとされてきたが、どのグループがどれほどの影響力を持っているのかは不明であった。本研究によって、植物プランクトンを捕食する原生生物ラビリンチュラ類が、大きな影響力をもつことが示唆されたことは、海洋生態系の理解を大きく進めるものになった。また、ラビリンチュラ類の現存量が漁獲量にも影響が及んでいる可能性があり、より精密なモニタリング必要性を示している。

研究成果の概要(英文)：DHA (docosahexaenoic acid) in fish is supposed to be supplied through the food chain as an essential fatty acid, but the micro-organisms that supply it are not clear. The labyrinthulean protists biosynthesize DHA, and the genus *Aplanochytrium* is known to prey on the living diatom *Skeletonema*. Therefore, we investigated the abundance and diversity of labyrinthuleans in the waters off Sanriku and estimated the accumulation of DHA in the copepods, and found that labyrinthuleans have a greater influence on higher predators than other DHA producers such as dinoflagellates and diatoms.

研究分野：微生物生態学

キーワード：海洋生態系 原生生物 ラビリンチュラ類 環境DNA ドコサヘキサエン酸 DHA

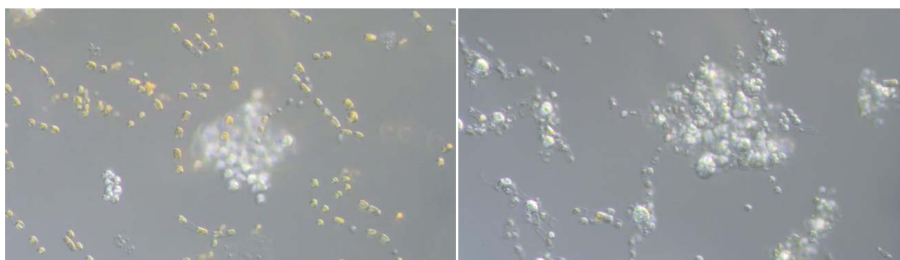
1. 研究開始当初の背景

単細胞の真核微生物であるラビリンチュラ類は、バイオ燃料や機能性食品、医薬となるドコサヘキサエン酸 (DHA: 22:6 n-3) などの不飽和脂肪酸や、アスタキサンチンなどの抗酸化色素などの産生能力と高い増殖速度から、応用面で注目されている。一方で、ラビリンチュラ類が熱帯から極域、表層から深海に至るまで、海洋に普遍的に存在していることから、生態系において重要な役割を果たしている可能性が指摘されていた。この生物群は、葉緑体を持たない従属栄養性であって、セルラーゼ、プロテアーゼ、キチナーゼなどの分解酵素を産生することが知られており、マングローブ域や河口、河川水の影響を受ける海域などで比較的豊富に存在することから、主に高等植物由来のデトリタスを対象とする分解者であると考えられてきた。水圏の生態系は、一次生産者を起点とする生食連鎖と、バクテリアによる有機物分解を起点として生食連鎖に組み込まれる腐食連鎖、いわゆる微生物ループが組み合わさって成立しているとされているが、ここに、真核生物であるラビリンチュラ類を起点とする、それまでに認識されていない経路が存在する可能性が指摘されていた。

そこで、研究代表者らは平成 23~25 年度の基盤研究 (C)、平成 29~31 年度の基盤研究 (B) およびの支援を受け、以下の研究を遂行した。

まず、夙川河口および大阪湾内の定点において、ラビリンチュラ類の細胞密度と出現する種の変遷についてモニタリングを行った。その結果、沿岸域において、ラビリンチュラ類は季節的遷移をしながら大きなバイオマスをもっており、バクテリアを起点とする微生物ループに比べて、サイズの大きいラビリンチュラ類からのエネルギー転送効率は、食物連鎖の段階が少なく、十分に大きな生態系への影響力をもっていることが示唆された (Ueda et al. AME 74 (2015): 187-204)。

また研究代表者らは、一次生産者の代表として珪藻類を対象として、ラビリンチュラ類の多様な系統群との間で混合培養をしたところ、ラビリンチュラ類の中でも、アプラノキトリウム類は生きていた珪藻スケルトネマの増殖を抑え、大きな増殖速度を示した。これまで、ラビリンチュラ類は分解者として考えられてきており、状態の良い増殖中の珪藻から栄養摂取を行う、いわば捕食者としての役割をもつ系統群が存在していることは、予想外の結果であった。また、詳細な観察の結果、仮足状の外質ネットを放射状に展開し、付着した珪藻を細胞体に引き寄せ、細胞塊を増大させながら、次々に内容物を摂取する様子が観察された (Hamamoto & Honda PLoS ONE 14 (2019): e0208941)。また、スケルトネマ以外の微細藻類に対する栄養摂取能力を確認したところ、様々な珪藻だけでなく、渦鞭毛藻類、緑藻類も捕食対象としていることが示唆されるに至っている。さらに、ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析を行ったところ、珪藻が豊富に蓄積するエイコサペンタエン酸 (EPA: 20:5 n-3) を、アプラノキトリウム類は DHA に変換するような組成を示すこと、また栄養段階を 1 つ経ているにも関わらず、珪藻の EPA がアプラノキトリウム類による消費量に比べて、生成される DHA が比較的多く、効率の良い転送がなされていることが示された (発表準備中)。



珪藻スケルトネマ (黄色) がアプラノキトリウム (白色) に捕食される様子。右の約12時間後では、珪藻が捕食され、黄色の色素が観察されず、アプラノキトリウムの細胞数も増加している。

さらに、世界中の海洋で網羅的に決定した 18S rDNA の配列を公開している Tara Ocean プロジェクトにおけるフィルターサイズごとの NGS 解析結果から、アプラノキトリウム系統群の 20% は、20-200 μm のサイズの粒子として検出されることも明らかとなった。またマリンスノーにもラビリンチュラ類が存在していることも報告されている (Bochdansky et al. ISME J 11 (2017): 362-373)。すなわち、アプラノキトリウム類の細胞の直径は 10 μm 程度だが、外質ネットを展開することで、直径 100 μm 以上の空間の珪藻を対象に積極的に栄養摂取を行っていることが示唆された。これらのことから、アプラノキトリウム類は様々な微細藻類から栄養摂取し DHA に変換して、外質ネットによって大きなサイズの粒子塊を形成することで、生態系のより上位の捕食者に効率よくエネルギー転送を行っていることが強く示唆された。

また、次世代シーケンサー（NGS）で大阪湾および北部太平洋（親潮域の外洋）の表層から底層の海水における 18S rDNA の配列を網羅的に決定したところ、読まれた配列数ではアプラノキトリウム系統群が全ラビリンチュラ類において主要群の一つであることが明らかとなった。一方で、LAB 7, LAB 15, LAB 16 といった命名された種を含まない未知の系統群が主要群に含まれること、底層ではオブロンギキトリウム類も主要群として出現することが明らかとなった（発表準備中）。また、ラビリンチュラ類全体の配列数は、珪藻類の 5-10% に相当し、重要な捕食者と目される繊毛虫類と同程度であった。さらに、アプラノキトリウム系統群が同時に採取された海水よりも高い割合でカイアシ類の消化管に存在していることを明らかにし、選択的に捕食している、あるいは消化管内で増殖するなどの未解明の関係を示唆した（Hirai et al. *Plankton Benthos Res* 13 (2018): 1-8）。

2. 研究の目的

上記のことから、ラビリンチュラ類は、系統群によって、デトリタスの分解者と一次生産者に対する捕食者の 2 つの役割をもっており、その現存量は海洋生態系において無視できないものと考えられた。特に、アプラノキトリウム系統群は、地球全体の一次生産の 20% を担っているとも言われる珪藻から直接に栄養摂取し、それが高次の動物プランクトンにつながるという、これまでに想定されていない強力な経路が存在している可能性がある。本研究では、ラビリンチュラ類の現存量と多様性を改めて把握し、さらに環境中の餌生物となる一次生産者や捕食者を明確にし、さらにそれらの間でのエネルギーフローの把握を目指すことで、ラビリンチュラ類の生態環境中での役割を解明するための基礎情報を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラビリンチュラ類の現存量と多様性の把握

大阪湾や北太平洋域などの外洋域において、定量 PCR 法による細胞数推定とメタ 18S 解析を組み合わせることによって、環境中におけるラビリンチュラ類やその他の真核生物の系統群の多様性と現存量の推定を行った。

(2) 環境海水でのラビリンチュラ類の直接観察

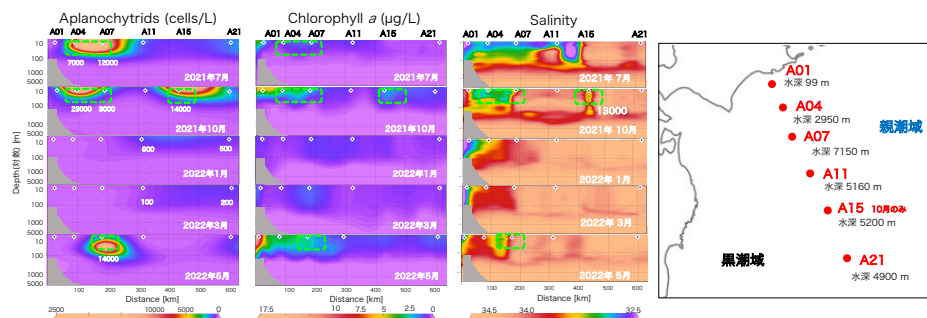
特に珪藻を捕食するアプラノキトリウム類に対する特異的プローブをデザインし、CARD-FISH 法によって蛍光染色して、環境中でのアプラノキトリウム類の形態を直接観察した。

(3) アプラノキトリウム類の EPA を DHA に変換する代謝経路の把握

培養液に $^{13}\text{C}_{18}$ オレイン酸を加えることで、ラベルした EPA を珪藻に生合成させ、アプラノキトリウム類に捕食させるなどの培養実験区を設定し、LC-MS で分析して代謝系を追跡した。

4. 研究成果

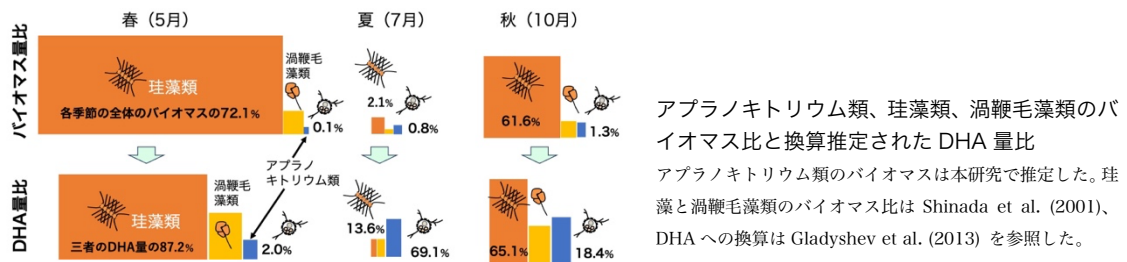
定量 PCR 解析によるアプラノキトリウム類の現存量推定の結果、春から秋の北部太平洋の親潮域では、表層近くのクロロフィル最大層では 10^4 細胞/L レベルの存在が確認された。アプラノキトリウム類の現存量が大きい値をとった A04、A07、A15 は、塩分や温度などからも親潮が影響していることが示唆され、クロロフィル濃度も高い状態となっていた。これはアプラノキトリウム類が藻類捕食性であることと矛盾がなかった。



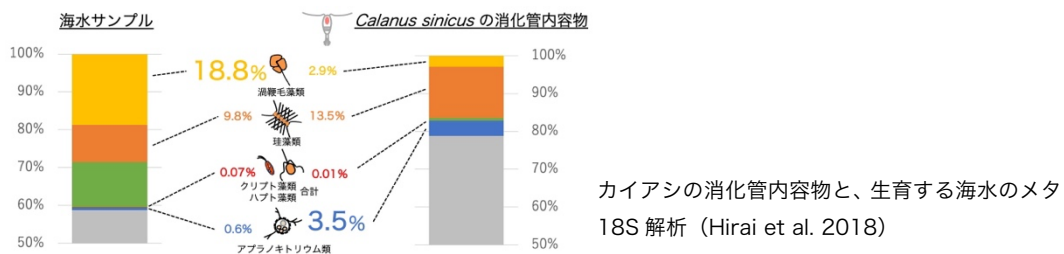
北部太平洋の親潮域におけるアプラノキトリウム類の現存量の季節的遷移（細胞/L）

推定されたアプラノキトリウム類の細胞数をバイオマス量に換算し、主要な植物プランク

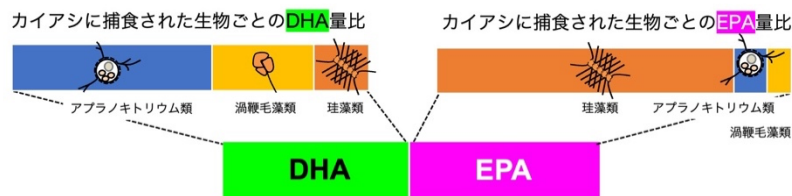
トンの珪藻類、渦鞭毛藻類と比較したところ、0.1 から 1.3%と非常に大きな影響をもつようなものではなかった。一方、バイオマス量から DHA 量に換算して比較すると、ラビリンチュラ類の DHA 含有率が大きいため、2.0 から 69.1%となった。春から秋を合わせた時には 12.4% となり、DHA の供給者としての影響力は比較的大きいことが明らかとなった。



Hirai et al. (2018) では、カイアシ類の消化管内容物と、そのカイアシが生息していた海水から環境 DNA を採取し、メタ 18S 解析の結果を報告している。この結果では、下の図のように、消化管内容物では、渦鞭毛藻類のリード数が大きく割合を減少させているのに対して、アブラノキトリウム類のリード数の割合が増加していた。すなわち、カイアシ類はアブラノキトリウム類を選択的に捕食することが示されている。



この捕食率を考慮して、珪藻類、渦鞭毛藻類、アブラノキトリウム類のカイアシへの DHA と EPA の供給量比を比較したところ、下図のようになり、DHA の供給率はアブラノキトリウム類が最大、EPA の供給率は珪藻類が最大となり、DHA と EPA の量比もほぼ 1 対 1 となり、魚類などでみられる量比と矛盾がなかった。



バイオマス比とメタ 18S 解析から推定された消化管内容物中の各生物の DHA と EPA 量比

CARD-FISH による特異的染色によって、アブラノキトリウム類は環境中では数十個の細胞がコロニーを形成して生息していることが予備的な観察で示されており、このコロニーのサイズがカイアシ類の捕食に適していることで、選択的に捕食されていると考察している。

また、アブラノキトリウム類の脂肪酸代謝経路を ^{13}C 安定同位体によって追跡したところ、炭素数 18 のオレイン酸から炭素数 20 の EPA への合成経路のはたらきが減衰している一方で、EPA から炭素数 22 の DHA への合成経路は十分にはたらいていることが明らかとなった。アブラノキトリウム類が捕食できる珪藻は EPA を豊富に蓄積しており、環境中でも常時 EPA を獲得できることから EPA を合成する経路が減衰していることが考えられた。逆に言えば、アブラノキトリウム類は環境中でも珪藻類を主要な栄養源としていることが示唆された。

本研究でアブラノキトリウム類の年間を通した現存量が初めて明らかとなったことで、動物プランクトンそして魚類が蓄積する DHA の供給に、ラビリンチュラ類が予想以上に大きな影響を及ぼしていることを示すことができた。漁獲量の変化にもラビリンチュラ類が関係していることも考えられ、さらに広範囲で精緻なモニタリングが必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Murakoshi Yumi, Shimeki Takayuki, Honda Daiske, Takao Yoshitake	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Sicyoidochytrium minutum DNA Virus Strain 001	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 1378(1-11)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00418-21	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 Ishibashi Yohei, Goda Hatsumi, Hamaguchi Rie, Sakaguchi Keishi, Sekiguchi Takayoshi, Ishiwata Yuko, Okita Yuji, Mochinaga Seiya, Ikeuchi Shingo, Mizobuchi Takahiro, Takao Yoshitake, Mori Kazuki, Tashiro Kosuke, Okino Nozomu, Honda Daiske, Hayashi Masahiro, Ito Makoto	4. 巻 4
2. 論文標題 PUFA synthase-independent DHA synthesis pathway in Parietichytrium sp. and its modification to produce EPA and n-3DPA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 e00418-21(1-2)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02857-w	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木元 佑磨, 馬詰 悠, 森本 冬海, 本多 大輔
2. 発表標題 ラビリンチュラ類パリエティキトリウム属株の核を標識する蛍光タンパク質遺伝子の導入
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木元 佑磨, 森本 冬海, 馬詰 悠, 本多 大輔
2. 発表標題 パリエティキトリウム属株の細胞核の蛍光染色を目指したプラスミド作製
3. 学会等名 第6回ラビリンチュラシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 えり, 橋本 航太郎, 石橋 洋平, 伊東 信, 本多 大輔
2. 発表標題 安定同位体脂肪酸を用いたアブラノキトリウム属株のDHA生合成経路の解析
3. 学会等名 第6回ラビリンチュラシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本 冬海, 浜本 洋子, 上田 真由美, 本多 大輔
2. 発表標題 大阪湾におけるオブロンギキトリウム類の現存量の推定
3. 学会等名 第6回ラビリンチュラシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 大輔
2. 発表標題 漁場環境を支える小さきもの：ラビリンチュラ ー魚類のDHAはどこからくるのかー
3. 学会等名 第181回海洋フォーラム「赤潮はどこまで解明されたか？ 最新科学が明らかにする海の素顔 」（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Laby Base http://syst.bio.konan-u.ac.jp/labybase/
--

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	菊地 淳 (Jun Kikuchi) (00321753)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	柏山 祐一郎 (Yuichiro Kashiya) (00611782)	福井工業大学・環境学部・教授 (33401)	
研究分担者	辻村 裕紀 (Yuki Tsujimura) (30880885)	地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所(環境研究部、食と農の研究部及び水産研究部)・その他部局等・研究員 (84410)	
研究分担者	今井 博之 (Hiroyuki Imai) (40278792)	甲南大学・理工学部・教授 (34506)	
研究分担者	桑田 晃 (Akira Kuwata) (40371794)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(塩釜)・主幹研究員 (82708)	
研究分担者	長井 敏 (Satoshi Nagai) (80371962)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(長崎)・主幹研究員 (82708)	
研究分担者	石橋 洋平 (Yohei Ishibashi) (90572868)	九州大学・農学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------