

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281012

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

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

研究代表者

鏡味 麻衣子 (KAGAMI, Maiko)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：20449250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼および海洋に生息するツボカビの多様性を解明するために、Single Spore PCR法を開発・適用した。印旛沼や琵琶湖では、新規クレードを含む多様なツボカビやクリプト菌が特定の珪藻に寄生していることが明らかになった。ツボカビは宿主特異性が高いと考えられてきたが、一種の菌が複数の珪藻に寄生することも判明した。東京湾においては、クリプト菌など多様な菌類が表水層に存在することが明らかとなった。ツボカビ生物量とツボカビを介した物質流Mycoloopの定量化のために、幾つかの方法を検討した結果、定量PCR法と培養実験、数理モデルを併用することで、それらの重要性を定量的に評価できた。

研究成果の概要(英文)：We developed Single-spore PCR methods to reveal the diversity of chytridiomycota in lakes and Oceans. In Lake Biwa and Lake Inba, we detected quite diverse fungi, including including novel lineages clades of chytridiomycota and other fungi such as Cryptomycota, infecting dominant diatoms. The extent of host specificity differed among species, that some fungi could infect various hosts. In Tokyo bay, various fungi including Cryptomycota were detected in the surface water. Quantitative PCR together with incubation experiments and mathematical models are useful approach for quantifying the importance of chytrids and roles of chytrids in material cycling in lakes and oceans.

研究分野：陸水生態学

キーワード：物質循環 生物多様性 湖沼 生態学 環境 微生物 琵琶湖 印旛沼

## 1. 研究開始当初の背景

ツボカビとは、鞭毛をもつ細胞（遊走子）を作る菌類の総称であり、他の生物に寄生する種や、有機物を分解する種など、現在 1000 種ほど報告されている。しかし、観察や計数、培養が困難なことから、野外での動態を把握した例は少ない。近年、ツボカビの新種が続々と発見されてきている。またツボカビの密度は鞭毛虫に匹敵するほど多い可能性が浮かび上がっている。これらの結果は、ツボカビはこれまで見過ごされていた、あるいは鞭毛虫と見間違えられていた事を意味しており、海洋も含めて水圏にはまだまだ多様なツボカビが存在しうる可能性が高い。

また、ツボカビは湖沼の食物網の中で重要な役割を担うことが明らかになりつつある。大型の植物プランクトンは動物プランクトンには直接捕食はされないが、ツボカビに寄生された場合には細胞内物質がツボカビ遊走子として水中に放出され、その遊走子がミジンコにたべられるため、ツボカビを介して間接的に食物網に組み込まれる。我々はこのツボカビを介した新たな物質流を、Mycoloop（菌類連鎖）と命名した。しかし、ツボカビ生物量や Mycoloop の定量化は困難を極めるため、未だ野外での重要性は定量的には評価されていない。

ツボカビの研究が遅れている背景には、GenBank(世界共通の塩基配列データベース)に登録されているツボカビの DNA データが少ないことも理由の一つである。GenBank 上のツボカビ DNA データで種名も記載されているものは培養が可能な分解性の種類に限られ、培養の難しい寄生性ツボカビについては代表者らが登録した種を含め数種類だけである。つまり、環境中から抽出した DNA シークエンス情報（環境 DNA 情報）を調べただけでは GenBank 上で寄生性ツボカビとマッチすることはなく、寄生性ツボカビは存在しないことになってしまうのである。この事は、形態的特徴が乏しいうえに、DNA データ不足のために、ツボカビは他の生物として検出されてきたを意味している。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 湖沼および海洋に生息するツボカビに焦点をあて、ツボカビの形態分類と DNA シークエンス情報を完全に一致させたデータベースを構築し、これまで見過ごされてきた水圏のツボカビの多様性を評価する。また、(2) モノクローナル抗体と定量 PCR 法、FISH 法を用いたツボカビの検出・定量方法を世界に先駆けて開発する。開発した定量方法と、元素安定同位体分析、操作培養実験により、(3) ツボカビを介した物質流 Mycoloop の野外における重要性を定量的

に評価する。これらの成果をまとめて(4) ツボカビを多様性と機能を考慮にいたした水圏の物質循環モデルを提示する。

## 3. 研究の方法

(1) ツボカビのデータベース構築、野外における多様性評価

植物プランクトンに寄生しているツボカビの 1 胞子から DNA を抽出し解析する Single Cell PCR 法を開発した。この方法では、光学・蛍光顕微鏡により観察したツボカビを直接ピペットにより吸い取り、PCR により DNA を増幅させることで、光学顕微鏡観察に基づく形態と DNA シークエンス情報を一致させることができる。開発した Single Cell PCR 法を琵琶湖と印旛沼に出現する植物プランクトンに寄生するツボカビに適用した。同時に、これらツボカビの単離培養を行い、培養が成功した種については、ツボカビの DNA をより詳細にシークエンスすると共に、様々な生活史段階を電子顕微鏡にて観察することで種名を同定し、分類名と DNA データと形態分類に基づく種名とを完全に一致させた。

次に、構築したデータベースを用いて、ツボカビ出現種の把握を網羅的に行った。具体的には、次世代シークエンサーを用いて環境中の DNA 情報を大量に解析し、データベースと照合することで、琵琶湖、印旛沼、東京湾においてツボカビ多様性を評価した。

(2) ツボカビ定量法の開発

これまで、ツボカビの計数にはキチン質を染色する蛍光染色法を用いてきた。しかし、ツボカビの生活史段階の一部（胞子体）しか染色できないため、野外での遊走子密度は不明であった。本研究では、ツボカビの定量方法として、新たにモノクローナル抗体、定量 PCR 法、FISH 法を用いた 3 つの方法の確立を試みる。これらの方法について、ツボカビの遊走子も含めた全ての生活史段階を対象に、かつ種レベルでの区別が可能な方法の開発を試みた。

モノクローナル抗体をツボカビに対して作成するのは、世界で初めての試みである。そこで、まず、確立している培養系（分解性のツボカビ *Rhizophyidium*）を用いて抗体を作成した。順次、野外からのツボカビ単離培養（研究）の進展状況に応じて、寄生性のツボカビについても抗体を作成した。

定量 PCR 法と CARD-FISH 法については、これまで上記培養系 (*Asterionella - Rhizophyidium*) を対象に適用したことがある。しかし、野外の試料への適用には至っていない。本研究ではこれまでの適用条件（プライマー、プローブの種類など）を参考に、野外の試料への適用方法を検討した。

(3) ツボカビを介した物質流 Mycoloop の

## 定量化

定量化する Mycoloop の対象として、(A) 植物プランクトン-寄生性ツボカビ-動物プランクトン、と(B)花粉-分解性ツボカビ-動物プランクトン、に着目した。

Mycoloop A <植物プランクトン-寄生性ツボカビ-動物プランクトン>

DNA 分析：動物プランクトン(ミジンコ)の消化管に含まれるツボカビ DNA 量を研究で開発した定量方法により測定することで、mycoloop を評価する方法の開発を試みた。

Mycoloop B <花粉-分解性ツボカビ-動物プランクトン>

陸上から流入した花粉由来の栄養塩(CNP)が、ツボカビを介して動物流れる量を元素・脂肪酸分析と成長実験から推定した。

元素・脂肪酸分析：各種ツボカビについて、元素(炭素、窒素、リン)含有量と脂肪酸組成を測定し、生物量と餌としての質を評価した。

成長実験：単離培養した系において、ツボカビ有無が動物プランクトンの成長に与える影響を評価した。

(4) 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の作成

上記の研究(1)(2)(3)を統合し、ツボカビを多様性と機能を考慮にいれた水圏の物質循環モデルの確立した。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・物質流、食物網構造や生物群集の安定性にどう影響するのかについて評価した。

## 4. 研究成果

(1) ツボカビのデータベース構築、野外における多様性評価

植物プランクトンに寄生しているツボカビの1胞子からDNAを抽出し解析するSingle Cell PCR法の開発に成功した(Ishida et al. 2015)。開発したSingle Cell PCR法を琵琶湖と印旛沼に出現する植物プランクトンに寄生する菌類に適用したところ、ツボカビを含む多様な菌類が存在していることが明らかとなった。ツボカビ門の中では既存(*Rhizophydiales*, *Chytridiales*, *Lobulomycetales*)に加え、新規クレードも検出された。さらに、ツボカビ以外にもクリプト菌門(*Cryptomycota*)とアフエリダ(*Aphelida*)といった、より原始的な菌も検出された。このことは、寄生性菌類はこれまで考えられてきた以上に多様であることを意味している。

これら多様な菌類と植物プランクトンとの関係を印旛沼において調べたところ、優占する珪藻 *Aulacoseira granulata* および *A. ambigua* に多様な菌類が寄生していることが

明らかになった。菌類の種類によっては、両方の珪藻に寄生できることもあきらかになり、本来宿主特異性が高いと考えられてきたツボカビの常識を覆す結果となった(Kagami et al. 投稿準備中)。琵琶湖についても、印旛沼と同様に、植物プランクトンに寄生するツボカビを含め、多様な菌類の存在が示唆された(Song et al. 投稿準備中)。東京湾については、寄生性のツボカビは検出されなかったが、クリプト菌や酵母などの菌類が海洋表層水中にも存在することが明らかとなった(Kagami et al. 投稿準備中)。

寄生性ツボカビのうち、7種10株の単離培養に成功した。これらの種については、ツボカビのDNAをより詳細にシーケンスすると共に、様々な生活史段階を電子顕微鏡にて観察することで種名を同定し、分類名とDNAデータと形態分類に基づく種名とを完全に一致させた(Seto et al. 投稿準備中)。

## (2) ツボカビ定量法の開発

ツボカビの定量方法として、モノクローナル抗体、定量PCR法、FISH法を用いた3つの方法の適用を検討した。

モノクローナル抗体については、分解性のツボカビと寄生性のツボカビを対象に作成を試みた。分解性のツボカビについては、抗原にもちいたツボカビに加え、ほかの種も染色したため、今後は特異性を高める必要がある。寄生性のツボカビを抗原とした抗体は、培養株の確立が遅れたことにより、現在も作成中である。

定量PCR法に関しては、培養しているツボカビ(*Rhizophyidium planktonicum*)を用いて、18S rDNA領域をターゲットしたプライマーとプローブの開発に成功し、適用した。しかし、特異性が低い可能性もでてきたため、改めてITS領域をターゲットにプライマーをデザインし、再実験を行った。その結果、特定の種について、水中の遊走子の量を精度よく検出することに成功した(Maier et al. 2016)。FISH法は、通常のFISH法とCARD-FISH法を試したが、いずれも染色がうまくいかず、条件検討が難しいことが判明した。

(3) ツボカビを介した物質流 Mycoloop の定量化

Mycoloopのうち、花粉-分解性ツボカビ-動物プランクトン、について、培養実験と元素分析により、その重要性を評価した。陸上から流入した花粉はリンを豊富に含むため、陸上から湖沼へ流入するリン源として非常に重要である。捕食実験より、ミジンコは花粉を直接捕食できないが、花粉を分解したツボカビの遊走子は捕食できることが明らかとなった。また成長実験より、花粉のみではミジンコはほとんど成長できないが、分解性ツボカビがいると成長速度が高くなることが明らかとなった。ツボカビにはミジンコの

成長に不可欠な不飽和脂肪酸が豊富に含まれること、リンが花粉にくらべて多い(C:P比が低い)ことが明らかとなり、質的にも良好な餌であることが判明した (Kagami et al. 投稿準備中)。

Mycloop のうち、植物プランクトン-寄生性ツボカビ-動物プランクトンの流れを定量するために、ミジンコの消化管中のツボカビの量を定量する方法を開発した。水中の遊走子を定量する方法と同様に ITS 領域をターゲットとしたプライマーを開発し、定量 PCR 法を適用したところ、消化管内のツボカビ DNA を成功することに成功した。定量 PCR 法が野外におけるツボカビを介した Mycloop の定量化のツールとして有効である可能性が示された (Maier et al. 2016)。

(4) 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の作成

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・物質流、食物網構造や生物群集の安定性にどう影響するのかについて、Dynamic モデルと Steady state model を比較した (Kagami et al. 2014)。Steady state model では物質流における重要性を評価できる一方、Dynamic model では物質流における重要性に加え、食物網の安定性や動物プランクトンの生産性なども評価できることが明らかとなった。両方のモデルを用いることで、ツボカビの食物網や物質流における役割を評価できると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Michelle Maier, Kimiko Uchii, Tawnya Peterson, Maiko Kagami (2016) Evaluation of daphnid grazing on microscopic zoospore fungi using comparative CT qPCR. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (in press), 査読有
2. 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, DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.004
3. Seiji Ishida, Daiki Nozaki, Hans-Peter Grossart, Maiko Kagami (2015) Novel basal fungal lineages from freshwater phytoplankton and lake samples. *Environmental Microbiology Reports* 7(3), 435-441. 査読有, DOI: 10.1111/1758-2229.12268.
4. Nobuyoshi Ishii, Seiji Ishida, Maiko

Kagami (2015) PCR primers for assessing community structure of aquatic fungi including *Chytridiomycota* and *Cryptomycota*. *Fungal Ecology* **13**: 33-43. 査読有, DOI:

10.1016/j.funeco.2014.08.004.

5. Kensuke Seto, Yosuke Degawa (2015) *Cyclopsomyces pluriloperculatus*: a new genus and species of Lobulomycetales (Chytridiomycota, Chytridomycetes) from Japan. *Mycologia* 107, 633-640, 査読有, DOI: 10.3852/14-284.
6. Masayuki Kawatsu, Gen Morimoto, Maiko Kagami (2015) Seasonal changes in the water bird community in Lake Inba; influence of floating-leaved macrophytes on habitat selection. *Aquatic Botany* 126, 32-37. 査読有, DOI:10.1016/j.aquabot.2015.06.003
7. Maiko Kagami, Takeshi Miki, Gaku Takimoto (2014) Mycloop: chytrids in aquatic food webs. *Frontiers in Microbiology* **5**: 166. 査読有, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00166.
8. Maiko Kagami Yutaka Hirose, Hisako Ogura (2013) Phosphorus and Nitrogen limitation of phytoplankton growth in Lake Inba, Japan. *Limnology* **14**: 51-58. 査読有, DOI: 10.1007/s10201-012-0385-5
9. H el ene Masclaux, Marie-Elodie Perga, Maiko Kagami, Christian Desvillettes, Gilles Bourdier, Alexandre Bec (2013) How pollen organic matter enters freshwater food webs. *Limnology and Oceanography* 58: 1185-1195. 査読有, DOI: 10.4319/lo.2013.58.4.1185.

[学会発表] (計 23 件)

1. Maiko Kagami, Daiki Nozaki, Takaki Nakamura, Wakana Hirano (2016) Hidden diversity and host specificity of parasitic fungi infecting phytoplankton in Lake Inba. 日本生態学会第 63 回全国大会、仙台国際センター (宮城県仙台市), 2016.3.24
2. Song P., Tanabe, S., Kagami M., Ban S. (2016) The diversity of parasitic fungi in Lake Biwa based on 18S rDNA sequence. 日本生態学会第 63 回全国大会、仙台国際センター (宮城県仙台市), 2016.3.24
3. 矢部詩織、中村昂樹、鏡味麻衣子、千賀有希子 (2016) ツボカビの寄生が珪藻 *Synedra* から産出する溶存有機物に与える影響—三次元励起蛍光スペクトル (EEM)-PARAFAC 法を用いた解析、日本生態学会第 63 回全国大会、仙台国際センター (宮城県仙

- 台市), 2016.3.24
4. 瀬戸健介(2015)藻類寄生性ツボカビの分類学的研究—未知のツボカビの正体を探る—日本微生物生態学会第30回大会亀城プラザ(茨城県土浦市), 2015.10.19
  5. Maiko Kagami, Daiki Nozaki, Kensuke Seto (2015) Diversity and functions of parasitic chytrids infecting phytoplankton in lakes. 1st plankton chytridiomycosis workshop (招待講演), Berlin, Germany, 2015.7.23.
  6. 瀬戸健介、出川洋介(2015)珪藻寄生性ツボカビ(ツボカビ門ツボカビ綱)の1新属,日本菌学会第59回大会,てんぶす那覇(沖縄県那覇市), 2015.5.17
  7. 鏡味麻衣子、本木安倫、Alexandre Bec (2015)分解性ツボカビがつなぐ花粉からミジンコへの流れ:第2のMycoloopの検証,日本菌学会第59回大会,てんぶす那覇(沖縄県那覇市), 2015.5.16
  8. 野崎大貴、石田聖二、平野稚奈、鏡味麻衣子(2015)珪藻に付着する真菌類胞子囊からのDNA抽出による分子系統解析,日本菌学会第59回大会,てんぶす那覇(沖縄県那覇市), 2015.5.16
  9. 福田有里、石田聖二、石井伸昌、鏡味麻衣子(2015)東京湾表水層中の真菌類の検出:DNA抽出方法の比較,日本菌学会第59回大会,てんぶす那覇(沖縄県那覇市), 2015.5.16
  10. 鏡味麻衣子(2015)食物網・物質循環を駆動する寄生生物(企画集会 Ecosystem parasitology:寄生から探る新たな群集生態学の展開),第62回日本生態学会,鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市), 2015.3.20
  11. 鏡味麻衣子、本木安倫、Alexandre Bec(2014)湖沼に流入した花粉はツボカビに介してミジンコに利用されるのか?第79回日本陸水学会,筑波大学(茨城県つくば市), 2014.9.11
  12. 石田聖二、野崎大貴、福田有里、鏡味麻衣子(2014)題目:淡水湖沼における真菌類の多様性~微量DNA分析技術による解明~第79回日本陸水学会,筑波大学(茨城県つくば市), 2014.9.11
  13. 野崎大貴、石田聖二、鏡味麻衣子(2014)印旛沼における珪藻付着性真菌類の形態観察及び分子系統解析,第79回日本陸水学会,筑波大学(茨城県つくば市), 2014.9.13
  14. Maiko Kagami, Yasumichi Motoki, Takeshi Miki, Gaku Takimoto, Alexandre Bec(2014) Mycoloop: The roles of parasitic and saprotrophic chytrids in aquatic food webs, The Joint Aquatic Sciences Meeting (JASM), Portland (Oregon) USA, 2014.5.22.
  15. Michelle Maier, Kimiko Uchii, Maiko Kagami, J. A. Needoba, Tawnya D. Peterson(2014) Development and application of quantitative PCR assays for studies of the aquatic Mycoloop, The Joint Aquatic Sciences Meeting (JASM), USA, Portland (Oregon), 2014.5.21.
  16. 石田聖二、野崎大貴、鏡味麻衣子(2014)「珪藻に付着する淡水性真菌類のおどろくべき多様性」平成26年度日本菌学会関東支部年次大会,東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区), 2014.4.19.
  17. 石田聖二、鏡味麻衣子(2014)微量DNA・シングルセル解析技術の生態学研究でのポテンシャル,第61回日本生態学会,広島国際会議場(広島県広島市), 2014.3.16.
  18. 石田聖二、野崎大貴、鏡味麻衣子(2014)微量DNA分析を用いた淡水生態学研究~湖底堆積物中のミジンコ遺骸と淡水寄生性ツボカビの事例~第61回日本生態学会,広島国際会議場(広島県広島市), 2014.3.16.
  19. 野崎大貴、石田聖二、鏡味麻衣子(2014)淡水寄生性ツボカビの多様性と宿主の関係性~Single Cell PCR法によるアプローチ~,第61回日本生態学会,広島国際会議場(広島県広島市), 2014.3.16.
  20. Maiko Kagami (Keynote lecture) (2013) Big microbes, but small fungi: Diversity and functions of chytrids in aquatic ecosystems"Big microbes: International workshop on microbial ecology for young scientists, 京都大学生態学研究センター(滋賀県大津市), 2013.11.18
  21. Seiji Ishida, Daiki Nozaki, Maiko Kagami(2013) "DNA extraction and amplification methods for single sporangium of chytrid parasites of freshwater phytoplankton - a direct approach to decipher diversity and

function of undescribed chytrid parasites"Big microbes: International workshop on microbial ecology for young scientists, 京都大学生態学研究センター(滋賀県大津市), 2013.11.18

22. 鏡味麻衣子(2013)印旛沼における植物プランクトンの成長制限要因ーリンか、窒素か？ー第78回日本陸水学会, 龍谷大学(滋賀県大津市), 2013.9.13
23. 鏡味麻衣子(招待講演)(2013)「泳ぐカビ: ツボカビの多様性と生態」 「湖沼におけるツボカビの多様性と機能」平成25年度日本菌学会関東支部年次大会 話題提供講演 「泳ぐカビ; ツボカビの多様性と生態」, 日本大学薬学部(千葉県船橋市), 2013.4.20

〔図書〕(計 3 件)

1. 川端善一郎・吉田丈人・古賀庸憲・鏡味麻衣子(2016)「感染症の生態学」(シリーズ現代の生態学 第6巻)共立出版, 380.
2. 鏡味麻衣子・佐藤拓哉(2016)病原生物の食物網・物質循環における機能(第7章).「感染症の生態学」(シリーズ現代の生態学 第6巻)共立出版, 87-99.
3. 佐藤拓也・鏡味麻衣子(2016)病原生物と宿主の種間相互作用(第6章).「感染症の生態学」(シリーズ現代の生態学 第6巻)共立出版, 73-86.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ  
東邦大学理学部湖沼生態学研究室

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

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・准教授  
研究者番号: 20449250

(2) 研究分担者

伴 修平 (BAN, Shuhei)  
滋賀県立大学・環境科学部・教授  
研究者番号: 50238234

細井(田辺) 祥子 (HOSOI-TABABE, Shoko)  
滋賀県立大学・環境科学部・助教  
研究者番号: 80423226

出川 洋介 (DEGAWA, Yousuke)  
筑波大学・生命環境系・助教  
研究者番号: 00311431

浜口 昌巳 (HAMAGUCHI, Masami)  
国立研究開発法人 水産総合研究センター  
ー 瀬戸内海区水産研究所・主幹研究員  
研究者番号: 60371960

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: