課題講演 No.2

陸水域における真核微生物の生態に関する最近の研究

1KB01 ～ 1KB04

コンビーナー：中野伸一（京都大学生態学研究センター）

日時：９月１１日（水）15:00～17:00

会場：Ｂ会場（２号館１０３講義室）

1KB01　琵琶湖河口域から沖帯にかけての真菌存在量と酵素活性

*藤永承平、中野伸一（京大・生態研）

１．はじめに

真菌は真核生物に分類され、地球上のあらゆる環境に生息する。彼らは抗菌物質等の資源として有用性が高いことが知られているが、物質循環過程においても重要な働きをしている。有機物分解での真菌の研究は盛んに行われているが、それらは土壌が主であり、水域では渓流部や湿地に限られている。微生物は有機物を分解する際、酵素を用いて有機物を小さな断片としているが、真菌は細菌に比べ酵素活性が高く、また、細菌には稀な酵素を持つため、難分解性有機物の分解者として物質循環過程で重要であることが知られている。

湖沼の水柱に生息する真菌は、植物プランクトンに寄生する菌や酵母が知られているが、真菌が水柱の有機物分解過程に与える影響は十分には研究されていない。真菌の存在量、及び機能を検出する手法が十分に確立されていなかったことが主な原因だが、近年、染色法等の確立により、水中での真菌の存在が認識されるようになってきた。これにより、古くから着目されてきた水中の、特に粒子付着画分での真菌の有機物分解の研究の促進が期待されている（Simon et al. 2002, Jobard et al. 2010）。

本研究では、湖沼における真菌の分布を調査し、さらに分画した試水の酵素活性を測定することで真菌の有機物分解への寄与を推定した。本講演では、水域における真菌の研究例を紹介した後に、この研究の結果を報告する。

２．材料と方法

調査地は、琵琶湖に流入する野洲川河口から沖帯にかけて水深が 5 m, 10 m, 30 m, 50 m の地点と野洲川河口及び、河口から約 3 km 上流の地点から表層水を月に一度採水した。真菌の計数は、Colony Formation Unit（CFU）を用いて行った。5 L の試水を孔径 5.0 μm の植物プランクトンネットで 50 ml に濃縮し、malt extract に抗菌物質（Tetracyclin, Streptmycin）を加えた培地に散布した。4 週間、25℃で培養後、プレート上に菌糸を伸ばすコロニーの数を計数した。一部のコロニーは顕微鏡観察、または、DNA を抽出して同定を行った。溶存態窒素（DIN）、溶存態無機リン（SRP）および溶存態有機リン（DOP）濃度を、比色法により測定した。β-Glucosidase, Cellobiohydroase, Phosphatase の活性は、試水を 5.0 μm, 0.2 μm のポリカーボネートフィルターを用いて分画し、蛍光標識された基質を加えて、25℃で６時間から 12 時間培養後に蛍光値を測定することで定量した。Phenoloxidase の活性は、基質を添加して２時間培養後、比色法により定量した。

３．結果と考察

真菌の培養計数は、5 月を除き、河川、河口では 1 – 2（CFU/mL）であり、湖内では水深によらず 0 – 1（CFU/mL）であった。また、真菌の培養計数は、5 月の河口域で 3.6（CFU/mL）と最も高い値を示した。真菌が多く検出された河川、河口では、糖の分解に関わる β-Glucosidase と Cellobiohydroase の活性が沖帯に比べて高かった。しかし、これらの酵素活性は、0.2 μm – 5.0 μm 分画の活性が高かった。水域生態系において有機物分解に寄与すると推察される真菌の大きさは、約 5.0 μm 以上であることから、真菌を含む画分の有機物分解への寄与は小さいと示唆された。また、本研究の対象水域から分離された菌の一部は土壌に由来することから、河口に生息する真菌は陸域から流されてきたものが水域に留まっているものと考えられた。一方、リグニン等の難分解性物質の分解に関わる Phenoloxidase は、河口で高いことが明らかとなった。この酵素は、細菌には稀な酵素である。これらのことから、真菌は、河口域で陸域から供給される難分解性の有機物の分解に寄与していると示唆された。

４．今後の展望

本研究から、水柱における糸状性の菌糸の存在量は少ないと考えられた。環境中でこれらの真菌の機能を評価することは、細菌等の真菌以外の生物の影響が強いので難しいだろう。今後は、単離した菌株を用いて、真菌が持つ機能の評価が望まれる。

本研究では、湖沼の水柱に存在する糸状性の真菌にしぼり、存在量や機能を評価しようと試みた。しかし、水柱には植物プランクトンに寄生、付着する真菌（ツボカビ）の存在量が多いことが知られている。現在、本研究と同じ水域のツボカビの存在量を計数しているところである。今後、湖沼の沖帯における真菌の評価は、これらの真菌も含めて再考されていくべきだろう。

1KB02 河口域定点における菌様原生生物ラビリンチュラ類の現存量と属組成の季節動態

*上田真由美（甲南大・院・自然科学），本多大輔（甲南大・理工）

１．はじめに

ラビリンチュラ類は海洋に生息する無色の菌様原生生物であり，鞭毛に中空の小毛を持つことで知られるストラメノパイル生物群に属するラビリンチュラ綱として分類されている。海洋では，有機物はバクテリアによって分解され，そのバクテリアを原生動物が補食しそれを動物プランクトンが補食することによって再び生食連鎖に組み込まれるという微生物ループの重要性が明らかになってきている。つまり，海洋の分解者として真核生物はほとんど注目されていない。真核従属栄養生物であるラビリンチュラ類はその生息域の広さと現存量の大きさから，海洋の分解者として重要な役割を果たしている可能性が示唆されてきている。しかしながら，ラビリンチュラ類が年間を通してどのような現存量変動をしているのか，どの属種が生態的に重要なのかといった情報はほとんどない。そこで，ラビリンチュラ類の現存量と構成する系統群の季節変動を把握するための継続的な定点調査を行った。

２．材料と方法

大阪湾に面した兵庫県西宮市を流れる夙川の河口 1 定点で 2008-2012 年の 5 年間，大阪湾の湾央と湾奥の２定点で 2011-2012 年の 2 年間，約 1 ヶ月ごとにサンプリングを行った。松花粉釣り上げ法と MPN 法を組み合わせた松花粉 MPN 法によってラビリンチュラ類の現存量を推定し，分離した株の 18S rRNA 遺伝子配列の分子系統解析により分離株の系統的位置の特定を行った。

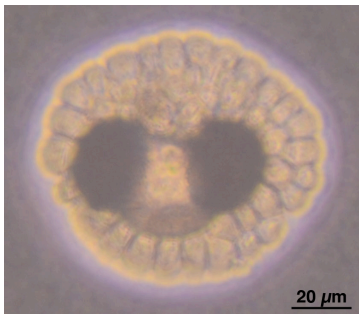
３．結果

夙川河口では 1 年おきに春から夏にかけて顕著な現存量の増加が見られ，ピーク以外でも平均約 5,000 cells/L のラビリンチュラ類が存在した。しかし，大阪湾での細胞数は少なく，ほとんどの月で 300 cells/L を下回っており，湾奥の表層水のみ毎年夏に現存量の増加が見られたが，細胞数は夙川河口の平均と同程度であった。夙川河口の系統群の変動は，春に未同定系統群１，それと入れ替わるようにして夏から秋にかけて未同定系統群２と *Aurantiochytrium mangrovei*，夏から冬にかけて，S*chizochytrium aggregatum*，秋から春にかけて *Oblongichytrium* sp.が出現するという傾向が見られた。一方大阪湾は，冬から春にかけて未同定系統群３，夏に *Aplanochytrium* sp.，不定期に *Oblongichytrium* sp.が出現するという傾向が湾奥・湾央ともにみられた。

４．考察

夙川河口の現存量の急激な増加は水温の急激な増加と塩分の低下が関係しているようであった。このことより，降雨により栄養源となる陸源有機物が河口に供給されたことと，水温の上昇に伴い，ラビリンチュラ類が活発化したことが細胞数の増加の要因になっているのではないかという仮定を立てた。さらに，生態効率を考慮して，ラビリンチュラ類の細胞数から換算した炭素量バイオマスをバクテリアの炭素量バイオマスと比較すると，海洋生態系に与える影響は無視できるものではないことが推測された。夙川河口と大阪湾で主に出現している系統群が異なったことより，大阪湾に生息している系統群は陸源以外の有機物を栄養源としており，大阪湾で出現せず夙川河口に生息している系統群は陸源有機物を栄養源としている可能性が考えられた。

ラビリンチュラ類は綱レベルの大きな生物群にもかかわらず，いままでひとくくりにしてその生態が考えられてきた。本研究で，継続的に現存量と属組成の季節動態を調査したことによって，注目すべき系統群が明らかになった。このことは，ラビリンチュラ類が何を栄養源とし，何に捕食され，どの程度のバイオマスとして生態系に寄与しているのかを明らかにするための基礎情報となるだろう。



松花粉（中央）に着生したラビリンチュラ類

1KB03

Seasonal changes in vertical abundance of kinetoplastid nanoflagellates in Lake Biwa with special reference to ecological importance of a particular flagellate group

*Mukherjee, I, H. Nishino, H. Takasu, Y. Hodoki and S. Nakano (Center for Ecological Research, Kyoto University)

Free-living kinetoplastid flagellates were often detected from aquatic environments in earlier microscopic studies, however they are not reported from the recent studies by molecular techniques using universal eukaryote DNA primers. In the present study, we have examined the seasonal changes in nanoflagellate diversity and annual vertical dynamics of kinetoplastid nanoflagellates which includes important bacterivorous flagellates in Lake Biwa, Japan.

For seasonal changes in nanoflagellate composition four 18S rRNA gene clone libraries were constructed from samples collected in four seasons (spring, summer, autumn and winter) by using universal eukaryote primers. Annual vertical dynamics of kinetoplastid nanoflagellates were studied using kinetoplastida class specific 18S rRNA CARD-FISH probes. 18S rRNA clone library data showed that, throughout the study period cryptomonads were the most dominant group of nanoplankton followed by ciliates. Heterotrophic nanoflagellate (HNF) groups which were detected in the clone libraries were bicosoecid, cercozoan and katablepharis whereas kinetoplastids were not detected from the clone libraries. However, CARD-FISH analysis frequently detected kinetoplastids, and they dominated (up to 46%) the heterotrophic nanoflagellate community in the hypolimnion during the stratified period where the abundance of total flagellate was low. SSU rRNA gene of kinetoplastids has undergone rapid evolution and due to which they are not targeted by universal eukaryote FISH probes, and this may be one possible reason for kinetoplastid flagellates being not detected in the clone libraries and pyrosequencing analysis using universal eukaryote DNA primers.

The present study demonstrated that kinetoplastids are not a rare group of flagellates and can become dominant in certain occasion and have some important ecological role.

1KB04

静岡県佐鳴湖におけるピコプランクトン群集の増殖と原生生物の捕食による死滅

*高巣裕之 (東大大気海洋研)、Jessica E. LeClair (京大生態研)、
山本貴幸、谷幸則 (静岡県大)、中野伸一 (京大生態研)

１．はじめに

富栄養汽水湖である佐鳴湖では、毎年夏季に *Synechococcus* sp. を主としたシアノバクテリアの大増殖が見られる。これらのシアノバクテリアは、細胞サイズが 1～2 μm と微小であり、細菌同様にピコプランクトンと呼ばれ、原生生物に摂食されることで微生物ループと呼ばれる有機物伝達経路を介して海洋・湖沼の食物網に寄与していると考えられている。我々のこれまでの調査では、佐鳴湖のシアノバクテリア優占時は珪藻等の大型植物プランクトンの現存量は低いことがわかっている。そのため、夏季の佐鳴湖では、*Synechococcus* 大増殖時には、生食食物網はほとんど機能しておらず、ピコプランクトン群集の駆動する微生物ループが佐鳴湖の食物網を支える重要な役割を担っているものと推測される。しかし、湖沼の *Synechococcus* の死滅速度に関しては知見が少ない上に、*Synechococcus* は細菌に比べて原生生物に摂食されにくいという報告もある。そのため、*Synechococcus* の大増殖が、微生物ループの駆動力として機能しているのかは明らかではない。本研究では、佐鳴湖の夏季の *Synechococcus* 大増殖時に、*Synechococcus* の炭素生産量と摂食損失量を評価することで、佐鳴湖 *Synechococcus* の有機物伝達者としての役割を評価した。

２．方法

佐鳴湖の夏季 *Synechococcus* 大増殖時に計 3 回、希釈培養法(Landry & Hassett 1982)を用いたピコプランクトン群集の増殖速度および原生生物(主に鞭毛虫)の摂食による死滅速度を評価する実験を行った。また、細胞数から炭素量に換算し、ピコプランクトンの炭素バイオマス生産速度と摂食による炭素バイオマス損失速度を算出した。

３．結果と考察

2012 年 8 月 1 日の実験では、栄養塩を添加した実験系において高い *Synechococcus* の生産が観察された (2003 μg C d^{-1})。これは栄養塩を添加しない場合に比べて約 4 倍高い生産速度であった。栄養塩無添加系では培養中に栄養塩が枯渇したものと考えられる。細菌の生産速度は、栄養塩無添加系では *Synechococcus* のそれを上回っていたものの、栄養塩添加による有意な増加は見られず、栄養塩添加系では *Synechococcus* の生産速度を下回った。すなわち、*Synechococcus* は栄養塩が豊富にある環境では、細菌より高い炭素生産速度を持つことが示唆された。*Synechococcus* の摂食損失速度は、栄養塩無添加系では生産速度を上回っており、1 日あたりに生産したバイオマスは摂食によって消費される計算となった。しかし、栄養塩添加系において *Synechococcus* の高い生産速度が見られた際でも、摂食損失量に無添加系と差は見られず、この時は半分以上の生産量が摂食されずに残存する計算となった。このことから、*Synechococcus* の生産速度が十分速いときには、摂食圧が細胞数の制御要因とならず、微生物ループに回らない大量の *Synechococcus* の炭素が佐鳴湖表層に蓄積し、夏季の大増殖につながることが示唆された。