

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成29年 2月28日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 福井県立大学 海洋生物資源学部

職 准教授

氏名 高尾 祥丈

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

沿岸・河川流入域におけるラビリントラ類の分布と有機物分解への寄与

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 高尾 祥丈	福井県立大学 海洋生物資源学部	准教授	ラビリントラ類の現存量測定 原生生物の単離
分担者 木貴之	福井県立大学大学院 生物資源学研究科	修士1年	ラビリントラ類の現存量測定
大林由美子	愛媛大学沿岸環境 科学研究センター	助教	現場海水中の有機物分解酵素活性 プロファイル
拠点対応教員			

3 研究内容（別紙）

研究課題名

沿岸・河川流入域におけるラビリントウ類の分布と有機物分解への寄与

Distribution and their ecological function of thraustochytrids in estuarine and coastal ecosystems

申請代表者 高尾 祥丈 福井県立大学 海洋生物資源学部

研究分担者 木 貴之 福井県立大学大学院 生物資源学研究科

大林 由美子 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

[研究目的]

一般的に海洋における有機物分解者としては、従属栄養細菌の働きのみが強調され、ラビリントウ類に代表される腐食性真核微生物の働きについてはほとんど解明されていないのが現状である。しかしながら、近年、現場海中に見られる有機物分解特性は細菌群集だけでは再現できないことが明らかとなってきている。

ラビリントウ類は、沿岸域において腐食性または寄生性生物として様々な試料(海水, 底泥, 藻類, 植物など)から普遍的に分離される直径5 - 20 μm ほどの無色真核微生物である。また、DHAなどの高度不飽和脂肪酸=PUFA(稚魚の成育に必須)、カロテノイド色素であるアスタキサンチン(抗酸化作用物質)などの高次生物群にとって重要な物質を高濃度に生産・蓄積する能力、熱帯・亜熱帯地域から極域や深海にまで及ぶ生息域の広さ、同じ海域に存在する浮遊性細菌の43 %にも達するバイオマスの高さなどから、本生物群は有機物分解により得たエネルギーを効率よく高次生物群に伝える生物として、陸源有機物の分解を起点とする食物網の要となりうる生物群である。

さらに、腐食性真核微生物である本生物群は、様々な細胞外有機物分解酵素活性を持つことが知られており、その生態学的特性に鑑みれば、海洋における有機物の分子変換プロセスに十分に寄与しうる生物群であると考えられる。ところが、水圏での溶存態有機物の分子変換や粒子態有機物の分解に対する寄与についての情報はほとんどない。そこで、河川流入域～沿岸域でのラビリントウ類の分布と水圏での有機物分解への寄与に関する情報を得ることを本研究課題の目的とした。

[研究内容]

沿岸・河川流入域におけるラビリント菌類の分布と有機物分解への寄与を明らかにするため、愛媛県重信川河口域を調査対象水域として2016年9月15～16日および11月17～18日の2回、図1に示す測点において、環境データの収集および、ラビリント菌類の現存量の計数、腐食性真核微生物の単離、海水中の有機物分解酵素活性試験に供する試水の採集をおこなった。

・ 海況調査

調査時の海況を把握するため、現場海域の環境データを収集した。海洋測点JE-0～5においては愛媛大学調査船「いさな」を利用し、CTDロガーを用いて観測をおこなった。河川測点であるSG1～3ではバケツ採水の後、ハンディーpHメーター、電気伝導度計、水温計によって環境水の物理化学的データを計測した。

・ ラビリント菌類の現存量分布

現場海域におけるラビリント菌類の分布を明らかにするため、測点SG-1, 2およびJE-0～3において現存量調査を実施した。河川測点SG-1, 2では水深が0.5m未満であったため表層低層混合水を、海洋測点JE-0～3では表層水および中層水を採集した。収集した各試料を保冷して研究室に持ち帰り、松花粉MPN法に供し、ラビリント菌類の現存量を算出した。また、11月の調査においては、本法で用いる培地を改良した手法（改良MPN法）でも現存量調査を実施した。

・ ラビリント菌類および腐食性真核微生物株の単離

現場環境水試料と腐食性真核微生物分離株の有機物分解酵素活性プロファイルの比較を目的として、全ての測点の試水からこれらの無菌分離株の確立をおこなった。各試料は採水直後に2x改良isonema培地に等量接種し、保冷して研究室に持ち帰った後、現場水温と同じ温度で集積培養を行い、キャピラリーアインレーション法による単離培養を行った。分離株の無菌化のため、抗生物質添加培地による培養と単離をくり返し実施した。

・ 有機物分解酵素活性の測定

各試水を保冷して実験室に持ち帰った後、全画分（濾過なし）、 $<2\ \mu\text{m}$ 画分（試水を孔径 $2\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過して得た濾液画分）、 $<0.2\ \mu\text{m}$ 画分（同 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過して得た濾液画分）のそれぞれについて、オリゴペプチド

MCA基質の分解活性を測定し、試水中のタンパク質分解酵素活性プロファイルを解析した。

[研究成果]

・ 調査時の海況

9月の調査時は、直前の天候不順により重信川の水量が増加していた。海洋測点においては、表層で比較的高水温・低塩分であったものの、明瞭な躍層は存在しなかった。11月の調査時は重信川の水量が少なく、沖合の測点 JE-2 および 3 では河川水の影響は見受けられなかった。また、全域にわたって成層は確認されなかった。

・ ラビリンチュラ類の現存量分布

9月の調査時のラビリンチュラ類の現存量は、JE-2, 3 では検出限界以下、その他の測点では $3.56 \times 10^2 \sim 2.30 \times 10^3$ cells / L であった。また、河川測点 SG-1, 2 においてラビリンチュラ類の現存量が高い結果となった(図 2. A)。しかし、JE-2, 3 においても、分離試験用のサンプル 10ml 中からはラビリンチュラ類が確認出来ており、実際には 10^2 cells / L オーダーでは存在していると予想された。また、本調査で明らかになった現存量は、夏季の瀬戸内海(広島湾, 大阪湾)におけるラビリンチュラ類の現存量と比較して1オーダー程度低い値であった。このため、腐食性真核微生物用の培地をベースとした改良MPN法を考案し11月の調査時に実施する事とした。

11月の調査では、松花粉MPN法ではSG-1, 2 においてのみラビリンチュラ類が検出され、海洋測点では全て検出限界以下となった(図 2. B)。一方、改良MPN法では全ての測点でラビリンチュラ類が検出され、河口の測点 SG-1, JE-0, 1 で比較的高い現存量が、沖合または河川上流に向けて現存量が低くなる傾向が確認出来た。両MPN法で見積もられた現存量に大きな違いが見られたことから、本海域のラビリンチュラ類の優占群が他の海域と異なっているか、松花粉MPN法が手法的に過小評価となっている可能性が考えられた。

・ ラビリンチュラ類および腐食性真核微生物株の単離

9月調査において、腐食性真核微生物株 43 株(ラビリンチュラ類 19 株, 分類群不明ネットワーク形成生物 12 株, ケルコゾア類 3 株, ディプロネマ類 4 株, 分

類群不明鞭毛虫 6 株)、 11 月調査では 21 株 (ラビリチュラ類 9 株, 分類群不明ネットワーク形成生物 7 株, ケルコゾア類 1 株, 分類群不明鞭毛虫 5 株) の確立に成功した (図 3.)。

- 有機物分解酵素活性の測定

有機物分解酵素活性のプロファイルデータは現在解析中である。

[今後の課題]

本研究課題の遂行により多くの新たな知見が得られた。ラビリチュラ類の現存量計数法については既存の方法の問題点が明らかになった。本研究課題で新たに実施した改良 MPN 法は比較的良好な結果を示しているが、従来法との検出感度や、検出可能分類群の違いなど慎重に検討していく必要がある。一方、腐食性真核微生物の単離試験においては、当初の目的通りラビリチュラ類株を確立すると共に、多くの腐食性真核微生物株の確立にも成功した。これらの中には、分類群不明ネットワーク形成生物のように増殖力も高く、普遍性も高いと予想される生物も含まれており、沿岸域生態系における分解者の活動を理解する上で重要な知見をもたらす可能性がある。今後は、これらの分離株の遺伝子解析による分子同定を行うと共に、培養試験において、それぞれの持つ有機物分解酵素活性のプロファイリングを行い、現場環境水中のデータと合わせて、水圏での溶存態有機物の分子変換や粒子態有機物の分解に対する寄与を明らかにしていく。

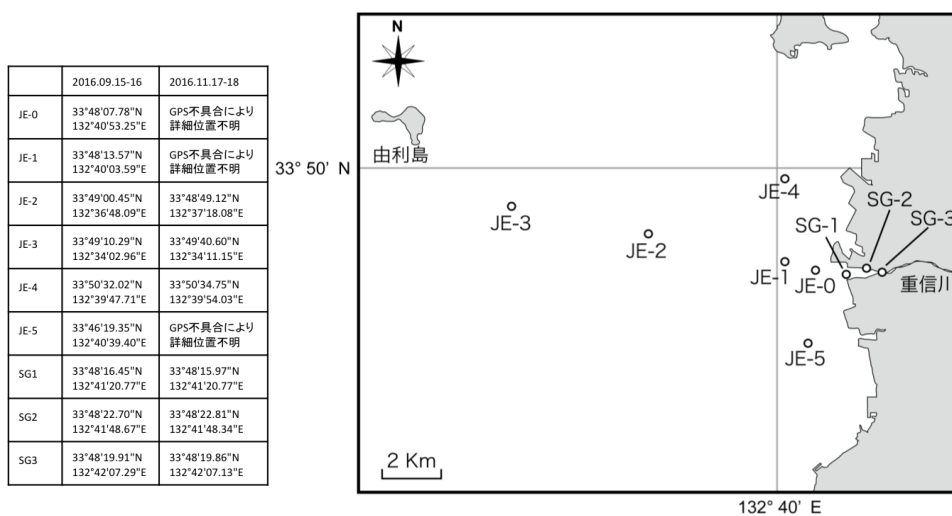


図 1. 調査測点の概略と調査時の GPS 位置情報

測点 JE-0 は調査時に可能な限り河口に接近して採水する可変測点とした。

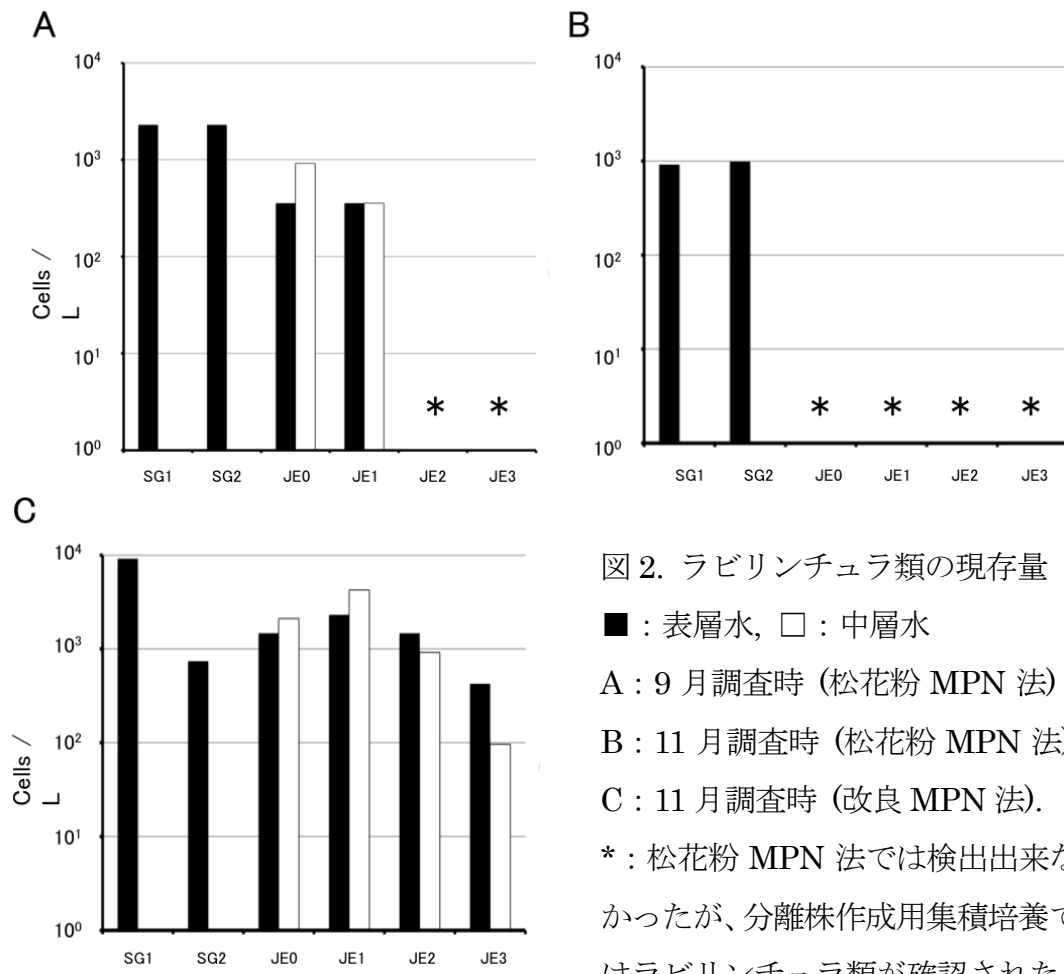


図 2. ラビリント菌類の現存量
 ■ : 表層水, □ : 中層水
 A : 9 月調査時 (松花粉 MPN 法) ,
 B : 11 月調査時 (松花粉 MPN 法),
 C : 11 月調査時 (改良 MPN 法).
 * : 松花粉 MPN 法では検出出来な
 かったが、分離株作成用集積培養で
 はラビリント菌類が確認された。

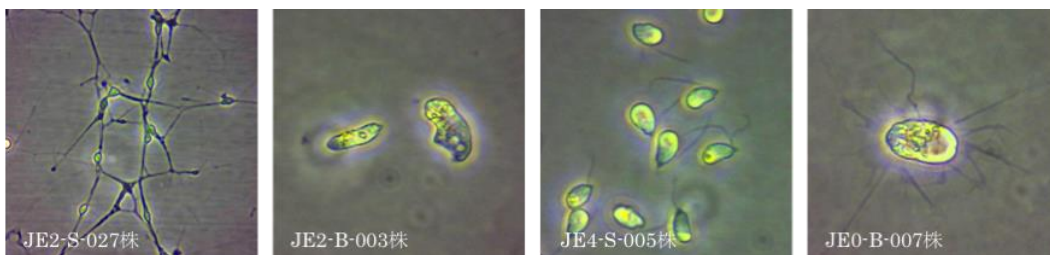


図 3. 本調査で分離した腐食性真核微生物株