

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30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

e-mail takyoshi@fpu.ac.jp

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腐食性真核微生物の多様性と有機物分解能

Diversity and their ecological role of saprotrophic protists in estuarine and coastal ecosystems

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2年	ラビリントラ類の現存量測定 多様性解析
拠点対応教員 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

3 研究内容（別紙）

研究課題名

沿岸・河川流入域における腐食性真核微生物の多様性と有機物分解能

Diversity and their ecological role of saprotrophic protists 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]

水圏生態系は、植物プランクトンによる一次生産を起点とした「生食連鎖」と、生態系から排出される有機物の分解を起点とする「腐食連鎖」によって支えられている。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るが、現場海水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分かりつつある。

ラビリンチュラ類は、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から普遍的に分離される直径 5 - 20  $\mu\text{m}$  ほどの無色真核微生物であり、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) やアスタキサンチン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、状況によっては同じ海域に存在する浮遊性細菌の 43 % にも達することが報告されているバイオマスの大きさなどから、食物網の要となりうる生物群であるといえる。また、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、海洋における有機物の分子変換プロセスにも寄与する生物群であると考えられる。

このような背景のもと、申請者らは平成 28 年度より LaMer 共同利用・共同研究として、愛媛県沿岸の河口域～河川流入沿岸域でのラビリンチュラ類の分布と有機物分解能に関する研究を開始した。平成 28 年度には、従来のラビリンチュラ類現存量調査法 (松花粉 MPN 法) では現存量を過小評価している可能性があることがわかり、新たに確立した改良 MPN 法を用いることで、重信川河口域に広くラビリンチュラ類が分布していることを明らかにした。平成 29 年度は、前年度の結果と

併せて、現場環境の有機物分解酵素プロファイルと単離したラビリンチュラ株およびその他の腐食性真核生物株についてその多様性と有機物分解特性を明らかにする事を目的とした。

#### [研究内容]

##### 1) ラビリンチュラ類の分布調査

昨年度に引き続き、愛媛県重信川河口域を調査対象水域として、沿岸・河川流入域におけるラビリンチュラ類の分布と有機物分解への寄与を明らかにするための調査を計画した。平成 28 年度調査においては、夏季 (9 月中旬) および秋期 (11 月中旬) の現場調査を実施したことから、本年度は冬季 (1 月中旬) に調査を実施することを計画したが、2 回の調査予定日のいずれも悪天候により調査船が出港できなかつたため、1 月 25 日に重信川河口の測点 (SG1, SG2) におけるラビリンチュラ類の分布調査のみを実施した (図 1)。測点 SG1 および SG2 において表層低層混合水を採集した。収集した各試料を保冷して研究室に持ち帰り、昨年度の共同研究で確立した '改良 MPN 法' を用いて、ラビリンチュラ類の現存量を算出した。

##### 2) ラビリンチュラ類および腐食性真核微生物の単離

1) と同じ試水からラビリンチュラ類および腐食性真核微生物の分離をおこなった。各試料は採水直後に 2x 改変 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-アイソ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。

##### 3) 河口域～河川流入海域の水中の有機物分解酵素活性プロファイルの解析

平成 28 年度の調査では、ラビリンチュラ類の分布調査と同じ測点における水中のプロテアーゼ活性を、バルク (濾過なし全画分)、 $<2 \mu\text{m}$  画分、 $<0.2 \mu\text{m}$  画分のそれぞれについて、アミノペプチダーゼ用 4 種類、トリプシン用 8 種類、キモトリプシン用 2 種類の計 14 種類のオリゴペプチド MCA 基質を用いて測定し、これら 14 種類の基質の分解速度をプロテアーゼ活性プロファイルとした。本年度も同様の調査を実施した上でラビリンチュラ類現存量およびその他の環境パラメータと併せて解析する予定だったが、悪天候により本年度は試料を採取できなかった。

そのため、平成 28 年 9 月と 11 月のプロテアーゼ活性プロファイルについて解析した。

#### [研究成果]

- ラビリンチュラ類の現存量分布

改変 MPN 法により求めたラビリンチュラ類の現存量は、本年度調査時（1 月、水温約 9℃）には SG1 で  $9.17 \times 10^2$ 、SG2 で  $1.46 \times 10^2$  cells/L であった（図 2）。重信川河口測点における現存量は、昨年度の秋期（11 月、水温約 18℃）の現存量と比較して 1 桁程度低い値であったが、水温の低下などにより生物活性が低くなる冬季においても、一定量のラビリンチュラ類が分布していることが明らかとなった。

- ラビリンチュラ類および腐食性真核微生物株の単離

2018 年 1 月の試水から作製した集積培養サンプルから、ラビリンチュラ類および従属栄養性真核微生物の単離株を作製中である。今後、平成 28 年 9 月および 11 月の試水から単離した株と併せて、遺伝子解析による種の同定と遺伝的多様性の解析、各株の持つ有機物分解能の解析を行う。

- 水中の有機物分解酵素活性プロファイルの解析

9 月と 11 月のいずれにおいても、河口の測点 SG1 から SG3 でのプロテアーゼ活性は、JE0 から JE3 の活性に比べて 1 桁から 2 桁高い値だった（図 3）。特に、SG 測点ではトリプシン型の活性が非常に高く、また、そのほとんどは  $<0.2 \mu\text{m}$  画分（いわゆる溶存態画分）にあることが分かった。河口域測点の水は見た目に濁っており、粒子態画分の活性が高いと予想していたため、溶存態画分の活性が圧倒的に高いというこの結果は意外なものだった。沿岸域 JE 測点でのプロテアーゼ活性プロファイルはこれまでに他の海域で測定した結果とよく似たパターンを示し、沿岸表層での一般的なプロファイルと考えられた。

#### [今後の課題]

今後は、本研究で得られた培養株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比較考察する。また、申請者らは本研究課題とは別にラビリンチュラ類の分類群毎の有機物分解特性の解析を共同で実施している。

これらの知見を合わせて、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腐食栄養性真核微生物の寄与を明らかにしていく。

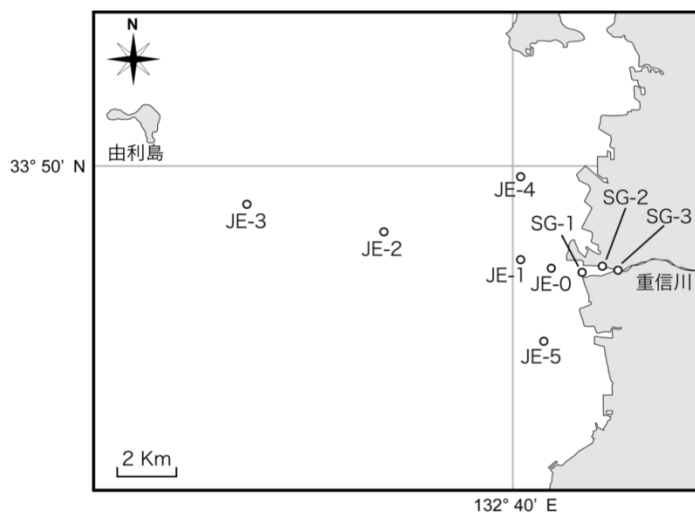


図 1. 調査測点位置

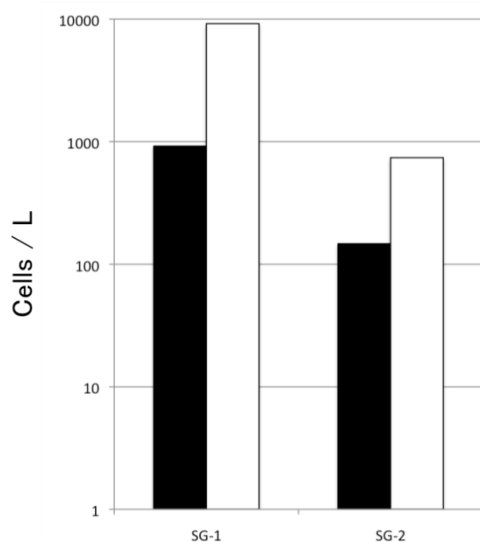
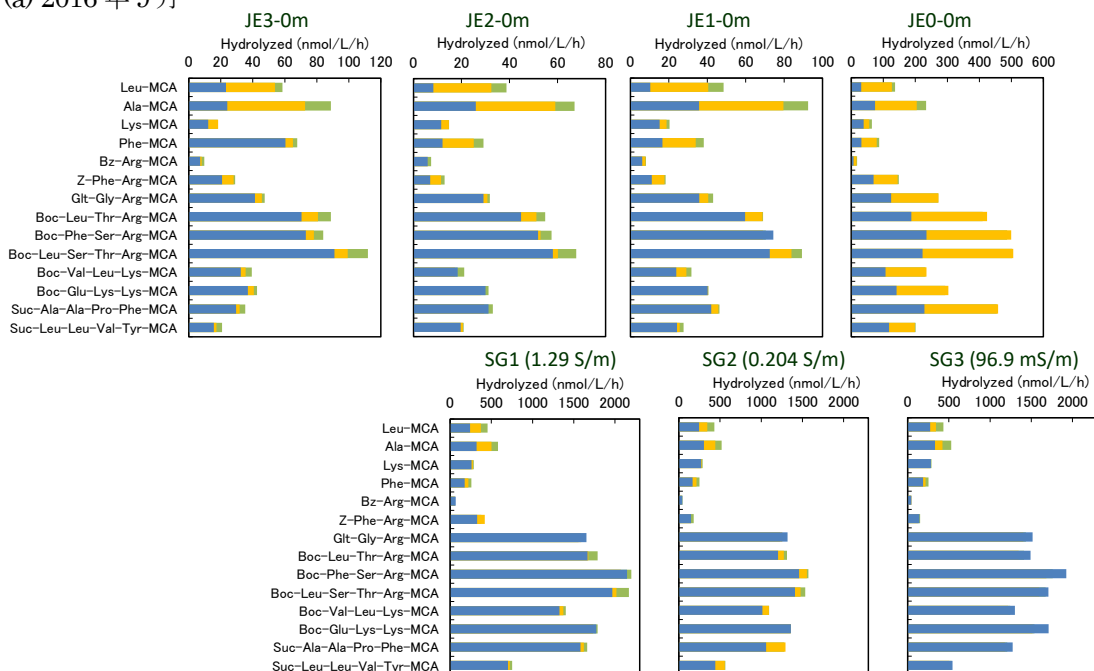


図 2. 重信川河口測点 SG-1 および SG-2 におけるラビリントキエラ類の現存量  
■ : 平成 30 年 1 月調査, □ : 平成 28 年 11 月調査

(a) 2016年9月



(b) 2016年11月

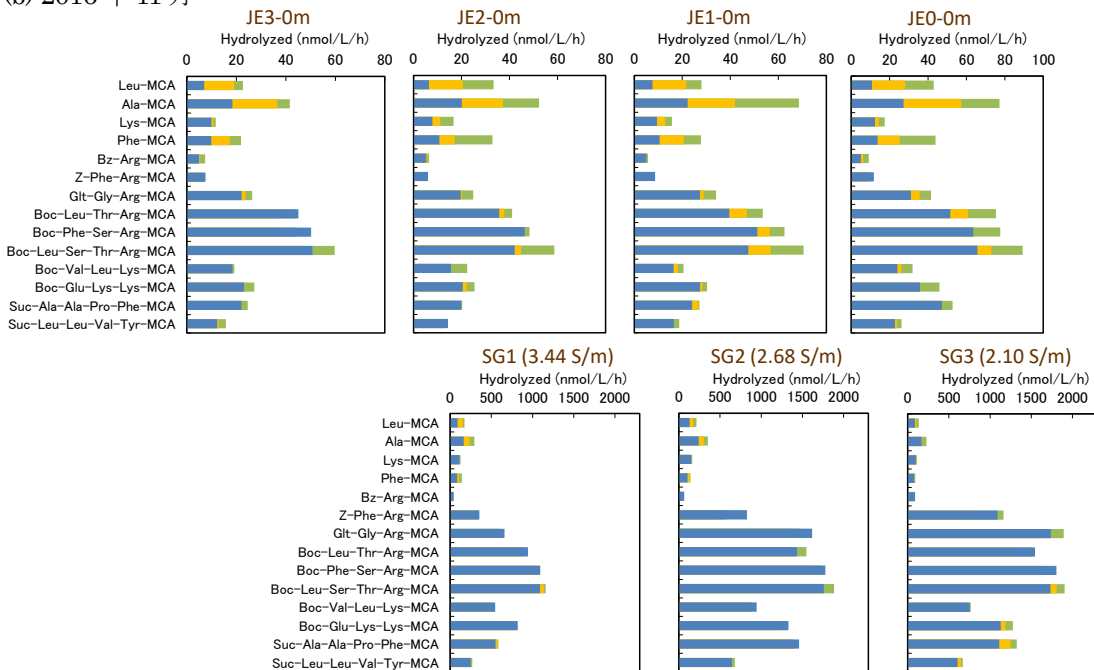


図3. 測点 JE-3 から JE-0 までの表層水と SG1 から SG3 までの水中のプロテアーゼ活性プロファイル。青： $<0.2 \mu\text{m}$  画分、橙： $0.2 - 2 \mu\text{m}$  画分、緑： $>2 \mu\text{m}$  画分。図によって、横軸のスケールは異なる。