

博士学位論文

海洋環境におけるラビリントウ類の生態学的役割と  
その影響に関する研究

Studies on Ecological Role and Effect of Labyrinthulids  
in Marine Environment (Labyrinthulea, Stramenopiles)

浜本 洋子  
Yoko HAMAMOTO

2019年

甲南大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻



## 要旨

原生生物ラビリントウ類は、分解酵素を分泌すること、陸源有機物が豊富な河口域に多く生息することなどから、分解者として認識されてきた。また、沿岸域から外洋、熱帯から極域、表層から深海まで、あらゆる海洋環境中に分布していることが知られているが、具体的な栄養源や生態学的な影響力については、明らかになっていなかった。

そこで本研究では、まず、海洋の一次生産者である植物プランクトンのうち、特に大きなバイオマスをもつ珪藻類を栄養摂取の対象としている可能性について検討した。系統的に多様なラビリントウ類と珪藻の二員培養を行った。その結果、*Aplanochytrium* は外質ネットで生きている珪藻に付着し、積極的に栄養摂取する様子が観察され、これまで認識されていなかった生食連鎖が存在することが明らかとなった。また、栄養摂取の過程で *Aplanochytrium* は珪藻と集合体を形成し、動物プランクトンが捕食できる大きさとなり得るため、食物網の中で効率よくエネルギーが転送されていると予想された。

次に、定量 PCR 法によって大阪湾に生息する *Aplanochytrium* の細胞密度を、季節ごとに推定した結果、1 年間の平均は湾奥で 13,000 cells/L、湾央で 2,100 cells/L であった。

さらに、推定された細胞密度から単位面積あたりの年間生産量を試算し、瀬戸内海で示されている炭素循環に適用することで、*Aplanochytrium* の影響力を評価した。その結果、真核生物に消費される植物プランクトンのうち、湾奥では 19.0%、湾央では 6.1% を *Aplanochytrium* が消費していること、また動物プランクトンが消費する炭素のうち、湾奥では 12.6%、湾央では 3.6% を *Aplanochytrium* が供給していると推定された。このことから、*Aplanochytrium* の生態学的な影響力は 1 属の生物として大きいことが示された。*Aplanochytrium* を含むラビリントウ類は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を体内で合成することができることから、動物プランクトンや魚類に DHA を供給していると考えられてきた。今回の結果は、*Aplanochytrium* が DHA の供給源となっていることを裏付けた。

また、環境 DNA に対する 18S rDNA の網羅的解読によるラビリントウ類の群集構造解析を行った。ラビリントウ類全体に対する *Aplanochytrium* 系統群と同定された配列の割合は、大阪湾では 60% 以上を占め、全球的な環境 DNA のデータベースでも 20% を超えており、環境中で主要な系統群であることが示された。

以上の結果から、これまで分解者としてひとまとめに認識されてきたラビリントウ類には、消費者としての役割をもつものが存在し、海洋生態系に大きな影響を与えていることが示唆された。

## 謝辞

まず、6年間にわたって、ご指導を賜りました甲南大学 理工学部 生物学科 本多 大輔 教授に心より感謝申し上げます。研究が順調なときも、うまくいかずにくじけそうなときも、いつもあたたかく見守ってくださりました。その優しさと励ましのおかげで、6年間研究を続けることができました。本当にありがとうございました。そして、本論文をご精読、貴重なコメントをいただきました、甲南大学 理工学部 生物学科 日下部 岳広 教授、渡辺 洋平 教授、久原篤 准教授、同大学 理工学部 機能分子化学科 茶山 健二 教授、池田 茂 教授に、深く感謝申し上げます。特に、統計処理に関するご指導をいただきました、甲南大学 理工学部 生物学科 後藤 彩子 講師に感謝申し上げます。

大阪湾での乗船調査に同行させていただき、またサンプルの採取提供をいただきました地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所 水産研究部海域環境グループ 主幹研究員 中嶋昌紀 博士（現：企画部 企画グループ）、主幹研究員 山本 圭吾 博士、技師 上田真由美 博士に深く感謝申し上げます。乗船調査で大変お世話になりました、同研究所 水産研究部の方々、調査船「おおさか」の乗組員の方々にお礼申し上げます。

2017年度若鷹丸第二次航海、2017年度北光丸第九次航海での乗船調査に同行させていただき、サンプルを採取提供いただきました国立研究開発法人水産研究・教育機構 東北区水産研究所 グループ長 桑田 晃 博士、主任研究員 黒田 寛 博士、研究員 谷内 由貴子 博士に深く感謝申し上げます。

ラビリントウ類の生態を研究している研究者として活発な議論をさせていただき、多くのご支援やご助言をいただきました、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 応用分子微生物学研究グループ 研究員 中井 亮佑 博士に深く感謝申し上げます。

分子生物学的な技術を丁寧にご指導とご助言をいただき、次世代シーケンサー解析のデータを解析いただきました国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所 グループ長 長井 敏 博士に深くお礼申し上げます。

動物プランクトンの食性解析を通して、ラビリントウ類が動物プランクトンに与える影響を考察するきっかけを与えてくださった東京大学 大気海洋研究所 助教 平井 惇也 博士に深くお礼申し上げます。

定量PCRによるラビリントウ類の細胞密度の推定を目指して、共に研究と議論を行い、多くの知識をいただきました東京慈恵会医科大学 博士研究員 庄野 孝範 博士に深くお礼申し上げます。

生態学的なアプローチや考え方、手法に関してご意見やご助言をいただきました横浜国立大学 大学院 環境情報研究院 教授 鏡味 麻衣子 博士に深くお礼申し上げます。

ヤブレッツボカビ類と植物プランクトン、動物プランクトン間の物質循環に関する考え方や技術に関してご意見やご助言をいただきました国立研究開発法人 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 菊地 淳 博士に深くお礼申し上げます。

走査型電子顕微鏡観察を行うにあたって、サンプルの処理や観察をご指導いただきました日本電子株式会社のみなさまに深くお礼申し上げます。

次世代シーケンサー解析を行うにあたって、ライブラリーの作製における技術や解析方法をご指導いただきました株式会社生物技研のみなさまに深くお礼申し上げます。

最後になりましたが、共に研究に励んできた系統分類学研究室のすべてのみなさまに心より感謝いたします。

なお、本研究の一部は、笹川科学研究助成（研究番号: 2018-7046, 2018 年度）、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 基盤研究（B）（研究課題番号: 17H03855, 2017-2020 年度）によって行われました。

# 目次

要旨	i
謝辞	ii
目次	iv
第1章 序論	1
第2章 背景	6
1.ラビリンチュラ類に関する知見	7
1.1.ラビリンチュラ類の分類	
1.2.ヤブレッツボカビ類の現存量調査の方法	
1.3.これまでのヤブレッツボカビ類の現存量調査	
1.4.極限環境下に生息するヤブレッツボカビ類	
1.5.ヤブレッツボカビ類の分解酵素活性	
1.6.多様な生物に付着するヤブレッツボカビ類	
1.7.ヤブレッツボカビ類の栄養摂取	
1.8.高度不飽和脂肪酸やカロテノイドの合成	
1.9.ヤブレッツボカビ類と動物プランクトン	
2.原生生物に関する知見	16
2.1.原生生物の高度不飽和脂肪酸	
3.海洋生態系	17
3.1.生食連鎖と腐食連鎖	
3.2.海洋生態系の基本概念	
3.3.生物のサイズと被食-捕食の関係	
3.4.瀬戸内海における炭素循環	
第3章 ヤブレッツボカビ類の珪藻からの栄養摂取の観察	24
1.材料と方法	25
1.1.使用した株と継代培養	
1.2.二員培養	

1.3.別府フラスコによる分解酵素と分解産物の影響の検討	
1.4.光学顕微鏡による二員培養の観察	
1.5.走査型電子顕微鏡による二員培養の観察	
2.結果	29
2.1.系統群ごとの栄養摂取能の比較	
2.2.二員培養の経時的な観察	
2.3.別府フラスコによる分解酵素と分解産物の影響の検討	
2.4. <i>Aplanochytrium</i> による珪藻からの栄養摂取の観察	
3.考察	32
3.1.珪藻に付着するヤブレッツボカビ類に関する報告	
3.2.ヤブレッツボカビ類と植物プランクトンの関係	
3.3.動物プランクトンによる <i>Aplanochytrium</i> の捕食	
3.4. <i>Aplanochytrium</i> と寄生性ツボカビとの比較	
4.図表	37
第4章 定量 PCR による <i>Aplanochytrium</i> の現存量調査	49
1.材料と方法	50
1.1.野外サンプリング	
1.2.定量 PCR による細胞密度の推定に向けた取り組み	
1.3. <i>Aplanochytrium</i> の1細胞あたりの18S rDNA コピー数の定量	
1.4. <i>Aplanochytrium</i> 系統群の細胞密度の推定	
2.結果	57
2.1.定量 PCR による細胞密度の推定に向けた取り組み	
2.2.大阪湾に生息する <i>Aplanochytrium</i> 系統群の細胞密度	
3.考察	61
3.1. <i>Aplanochytrium</i> 属特異的プライマーの特異性	
3.2.定量 PCR に適した DNA 抽出法の検討	
3.3. <i>Aplanochytrium</i> の18S rDNA のコピー数と他の真核生物との比較	
3.4.これまでのヤブレッツボカビ類の現存量調査との比較	
3.5. <i>Aplanochytrium</i> 系統群の生産速度の推定	
3.6. <i>Aplanochytrium</i> 系統群の季節的な鉛直移動	
3.7. <i>Aplanochytrium</i> による高度不飽和脂肪酸の供給	
4.図表	68

第5章 次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析	87
1.材料と方法	88
1.1.TARA OCEANS のデータ解析	
1.2.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析	
2.結果	98
2.1.TARA OCEANS のデータ解析	
2.2.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み	
3.考察	104
3.1.TARA OCEANS のデータ解析	
3.2.大阪湾に生息するプランクトンの群集構造解析	
4.図表	107
 第6章	
総合考察： <i>Aplanochytrium</i> を中心とした経路が海洋生態系に与える影響	148
 引用文献	165

# 第1章 序論



陸上では、陸上植物(=生産者)を起点とし、さまざまな陸上生物(=消費者)が関係する“食う・食われる”の関係である生食連鎖が存在する。また、生物の死骸や糞便などを分解するバクテリアや真菌類(=分解者)を起点とする腐食連鎖が存在し、陸上生態系において重要な役割を果たしていると認識されている。一方、海洋にも、植物プランクトン(=生産者)を起点とし、さまざまな大きさや役割をもつ動物プランクトンや原生生物(=消費者)が関係する生食連鎖が存在する(例えば、Steele 1974)。さらに、生物の死骸や陸源有機物などの有機物は、原核生物であるバクテリア(=分解者)が分解し、バクテリアは原生生物に捕食されることで生食連鎖に組み込まれる微生物ループと呼ばれる経路が、海洋生態系において重要な役割を担っていると考えられている(例えば Azam et al. 1983)。原核生物だけでなく、真核生物である真菌(子嚢菌)、ツボカビ、サカゲツボカビも有機物分解を分解することが報告されている(Hyde et al. 1998)。さらに、現存量の大きさと生息域の広さから、真核生物の分解者であるラビリンチュラ類が注目されている(Kimura et al. 2001, Kimura and Naganuma 2001, Ueda et al. 2015)。

ラビリンチュラ類は、ストラメノパイル生物群のラビリンチュラ綱の生物群である(Porter 1990, Anderson and Cavalier-Smith 2012)。近年の分子系統学的な解析により、ラビリンチュラ類は少なくとも4つの系統群に分かれ、ヤブレッツボカビ類 [thraustochytrids] , アプラノキトリウム類 [aplanochytrids] , オブロンギキトリウム類 [oblongichytrids] , 狭義のラビリンチュラ類 [labyrinthulids] に分かれることが明らかになった(例えば, Yokoyama et al. 2007, Tsui et al. 2009, Anderson and Cavalier-Smith 2012, Marchan et al. 2018)。本論文では、4つのグループをまとめて「ラビリンチュラ類」とした。また、細胞は紡錘形の狭義のラビリンチュラ類とは異なり、狭義のヤブレッツボカビ類, オブロンギキトリウム類, アプラノキトリウム類の細胞は球形である。また、現存量調査では、その手法上、3つのグループはまとめて評価されることが多い。以上のような生態学的な観点から、本論文では「ヤブレッツボカビ類」として表現する。また、培養株として実在する場合は *Aplanochytrium*, 大きなグループとして表す場合は *Aplanochytrium* 系統群として表現する。

ラビリンチュラ綱に属する生物はボスロソームとよばれる細胞小器官をもつ(Moss 1985, Porter 1969, 1972, 1990, Perkins 1972, 1973a)。ボスロソームから外質ネットを放射状に伸長し、セルロースやプロテアーゼ, アミラーゼなどの分解酵素を分泌することで、難分解性の有機物を分解することが知られている(Raghukumar et al. 1994, Bremer 1995, Bremer and Talbot 1995, Taoka et al. 2009, Kanchana et al. 2011, Nagano et al. 2011, Iwata and Honda 2018)。

ヤブレッツボカビ類の生態学的な影響力が注目されるなか、現存量調査が世界中の海洋で行われ、汽水、沿岸、外洋、深海、熱帯、極域など様々な環境に存在すると報告されている(Ulken 1986, Kimura et al. 1999, Raghukumar et al. 2001, Bongiorno et al. 2004, Naganuma

et al. 2006)。しかしながら、どのような系統群が、いつ、どれほど存在しているのかといった継続的な調査はほとんど行われていなかった。近年になって、ヤブレッツボカビ類の細胞密度の生態系における影響力を評価するために、河口域と沿岸域において、マツ花粉 MPN 法によるヤブレッツボカビ類の現存量と構成系統群の季節変動の継続的な調査が行われた (Ueda et al. 2015)。その結果、河口域と沿岸域では構成系統群が異なり、季節変動していたことから水温や塩分などの環境要因によってすみ分けをしている可能性が示された。

また、ラビリンチュラ類は海洋生物の表面に存在する (Raghukumar 1987, Gaertner 1979, Siboni et al. 2010 など)。例えば、採取された野外サンプルから、ヤブレッツボカビ類が珪藻に付着している様子が観察されている。ヤブレッツボカビ類が珪藻に付着している様子を初めて観察したのは、Gaertner (1979) であり、ノルウェーで採取したサンプルを光学顕微鏡で観察し、*Schizochytrium* 属が、*Thalassiosira nordenskiöldii*, *Chaetoceros* sp., *Thalassionema nitzschioides* に付着していたと報告した。珪藻に付着したヤブレッツボカビ類の成長に伴い珪酸質の被殻の中で珪藻の細胞質が収縮している様子が観察された。Raghukumar (1986) は *Ulkenia visurgensis* が *Coscinodiscus* sp., *Navicula* sp., *Nitzschia* sp., *Grammatophora* sp., *Melosira* sp. に付着していたと報告した。

前述したように、ヤブレッツボカビ類は難分解性の有機物を分解する分解酵素を分泌することから、分解者として認識されている。さらに、ヤブレッツボカビ類の何を分解しているかを推測するため、ヤブレッツボカビ類の細胞密度とクロロフィル *a* 濃度および懸濁態有機炭素 (POC) や溶存態有機炭素 (DOC) との相関分析が行われている。ヤブレッツボカビ類の細胞密度はクロロフィル *a* 濃度とはあまり相関がなく、POC や DOC と高い相関がみられたことから、植物プランクトン以外の生物を由来とする POC を栄養源としていると考えられた (Kimura et al. 2001)。河口域の POC と沿岸域の POC は種類が異なることから、河口域では、落ち葉やデトライタスなどの陸源有機物を、沿岸域では植物プランクトンの死骸を栄養源にしている可能性が示された (Ueda et al. 2015)。一方、ヤブレッツボカビ類の現存量とクロロフィル *a* 濃度に正の相関があるという報告もある。河川の影響を受けている瀬戸内海やアラビア海では、ヤブレッツボカビ類の現存量はクロロフィル *a* 濃度と正の相関がみられた (Naganuma et al. 1998, Kimura et al. 2001, Raghukumar et al. 2001)。また、ハワイ沖で行われた調査では、ヤブレッツボカビ類の細胞密度が高い水深とクロロフィル *a* 濃度が高い水深が一致していることが報告されている。同時に採取したサンプルから DNA を抽出し、ヤブレッツボカビ類に特異的なプライマー (LABY-A, LABY-Y) で増幅したアンプリコンの配列を決定した。その結果、配列が決定した OTUs の大部分が *Aplanochytrium* に一致することが示された (Li et al. 2013)。

また、野外から採取された動物プランクトンの腸管や糞便ペレットから、ヤブレッツボカビ類が検出されている (Raghukumar and Raghukumar 1999, Damare and Raghukumar 2006,

2010, Hirai et al. 2018)。なかでも、18S rDNA メタゲノミクス解析によって *Aplanochytrium* 系統群の配列が *Calanus sinicus* の消化管内容物から検出された。この調査から、*Aplanochytrium* が *C. sinicus* の主要な餌である可能性があることが示された。さらに、*Aplanochytrium* のリード数の割合が海水（環境サンプル）の *Aplanochytrium* のリード数の割合よりも消化管内容物の方が高いことから、*C. sinicus* が *Aplanochytrium* を積極的に餌食として選択したことが示唆された。これまでに、ヤブレッツボカビ類は高度不飽和脂肪酸を合成・蓄積することが報告されている (Lewis et al. 1999, Fan et al. 2000, Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Kaya et al. 2011, Nakazawa et al. 2014)。ヤブレッツボカビ類は、動物プランクトン、さらには高次栄養段階の捕食者への高度不飽和脂肪酸の重要な供給源の候補として、クリプト藻、珪藻、プラシノ藻、渦鞭毛藻類、ハプト藻とともに挙げられている (Brown 1997, Delong and Yayanos 1986, Yongmanitchai and Ward 1989, Zhukova and Aizdaicher 1995, Mansour et al. 1999, Russell and Nichols 1999, Kawachi et al. 2002, Pratoomyot et al. 2005, Lin et al. 2008, Chen et al. 2012, Gladyshev et al. 2013)。しかしながら、ヤブレッツボカビ類が何から栄養を摂取し、何に捕食されているかについては野外調査の結果などによって推測されており、培養実験による研究はほとんど行われていない。そのため、ヤブレッツボカビ類の生態学的な役割は明確になっていない。

また、ヤブレッツボカビ類の現存量調査は、マツ花粉 MPN 法やアクリフラビン直接計数法によって行われているが、問題点があることが指摘されている (Ueda et al. 2015)。マツ花粉 MPN 法は、ヤブレッツボカビ類の遊走細胞がマツ花粉への走化性を示すことを利用したマツ花粉釣りえさ法と、希釈系列を作製し培養によって細胞密度を推定する MPN 法とを組み合わせた方法である (Gaertner 1968)。ヤブレッツボカビ類がマツ花粉への走性をもつこと、抗生物質を含む寒天培地上で増殖することが前提となるため、マツ花粉に対する走化性がないヤブレッツボカビ類や寒天培地で増殖できなかったヤブレッツボカビ類が存在すると、現存量が過小評価されてしまう (Ueda et al. 2015)。また、アクリフラビン直接計数法は、アクリフラビンという色素でヤブレッツボカビ類の細胞壁に特異的に存在する硫酸多糖を染色し、蛍光顕微鏡下で直接計数する方法である (Chamberlain 1980, Raghukumar and Schaumann 1993)。この方法では、遊走細胞や細胞壁が薄いヤブレッツボカビ類は染色されにくいので、計数できない場合がある (Raghukumar and Schaumann 1993, Naganuma et al. 1998, Kimura et al. 2001, Raghukumar 2002)。そのため、ヤブレッツボカビ類の海洋生態系における役割やその影響力が過小評価されていると考えられる。近年、細胞密度を過小評価しないように、分子生物学的な手法である定量 PCR による細胞密度の推定も試みられている (Nakai et al. 2013)。系統群に特異的なプライマーを使用した定量 PCR とアクリフラビン直接計数法によってヤブレッツボカビ類の細胞密度が推定された。その結果、アクリフラビン直接計数法ではヤブレッツボカビ類が検出

されたにも関わらず、定量 PCR では検出できなかったサンプルが数多くあった。この結果から、定量 PCR によるヤブレッツボカビ類の細胞密度の推定は確立しているとはいえない状況である。また、環境 DNA のクローニング解析によって、未確認のヤブレッツボカビ類の存在も示唆されているが (Collado-Mercado et al. 2010, Li et al. 2013) , 定量 PCR では、このような未確認のヤブレッツボカビ類を検出することは困難である。さらに、データベースにラビリンチュラ類として登録されている小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子の系統解析が行われ、環境 DNA のみで構成された 20 のクレードが存在することが明らかになった (Pan et al. 2017)。

以上のように、ヤブレッツボカビ類が何から栄養を摂取し、何に捕食されているかという生態学的な役割は明らかになっておらず、沿岸環境中の物質循環の中における影響力の評価も十分とはいえない。

そこで本研究では、ヤブレッツボカビ類の生態学的な役割を把握し、海洋生態系の炭素循環について考察することを目的に、以下のような研究を行った。1) 系統的に多様なヤブレッツボカビ類と海洋の主要な一次生産者である珪藻の二員培養を行った。2) 生きている珪藻から積極的に栄養を摂取することが明らかになった *Aplanochytrium* を対象とし、定量 PCR による細胞密度を推定した。3) *Aplanochytrium* 以外に注目すべき系統群を把握するために、次世代シーケンズ解析によってプランクトンの群集構造解析を行った。

## 第2章 背景

## 1. ラビリンチュラ類に関する知見

### 1.1.ラビリンチュラ類の分類

ラビリンチュラ類はストラメノパイル生物群 [stramenopiles] に位置し (Patterson 1989, Porter 1989, Honda et al. 1999, Adl et al. 2012, Anderson and Cavalier-Smith 2012, Pan et al. (2017) ボスロソーム [bothrosome] とよばれる細胞小器官から伸長される外質ネット [ectoplasmic net] をもつことで特徴づけられている (Porter 1969, Perkins 1972, Porter 1972, Perkins 1973, Moss 1985, Porter 1989)。

狭義のヤブレッツボカビ類 [thraustochytrids], アプラノキトリウム類 [aplanochytrids], オブロンギキトリウム類 [oblongichytrids], 狭義のラビリンチュラ類 [labyrinthulids] の少なくとも 4 つの系統群から構成される (Porter 1989, Anderson and Cavalier-Smith 2012, Leander and Porter 2001, Leander et al. 2004, Yokoyama and Honda 2007, Tsui et al. 2009, Doi and Honda 2017, Marchan et al. 2018, 図 2-1) 。

狭義のヤブレッツボカビ類は、近年の分子系統解析によって、複数の属が単系統とならないことが明らかとなっている。現在は、生活史、形態、高度不飽和脂肪酸 [poly-unsaturated fatty acid: PUFA] やカロテノイド [carotenoid] の組成に基づいて *Thraustochytrium* (Sparrow 1936), *Japonochytrium* (Kobayashi and Ookubo 1953), *Schizochytrium* (Goldstein and Belsky 1964), *Ulkenia* (Gaertner 1977), *Aurantiochytrium* (Yokoyama and Honda 2007), *Sicyoidochytrium*, *Parietichytrium*, *Botryochytrium* (Yokoyama et al. 2007), *Monorhizochytrium* (Doi and Honda 2017) の 9 属に分類されている。

アプラノキトリウム類は *Aplanochytrium* 属から構成されている (Bahnweg and Sparrow 1972)。細胞は六角形の鱗片で包まれており、鞭毛を持たない不動胞子 [aplanospore] を放出する。

オブロンギキトリウム類は *Oblongichytrium* 属から構成されており、細長い長円形の遊走細胞 [zoospore] によって特徴付けられる (Yokoyama and Honda 2007)。

狭義のラビリンチュラ類は *Labyrinthula* 属から構成されている (Cienkowski 1867)。細胞は紡錘形をしており、細胞表面にあるボスロソームから伸長した外質ネットに包まれており、細胞は外質ネット内を滑るようにして動く。

他にも、オルソニア類 [Althorniidae] がラビリンチュラ類として記載されている (Jones and Alderman 1971)。この系統群はボスロソームをもたず、外質ネットを伸長しない。18S rDNA の配列を決定する前に株が失われており、形態学的特徴に基づいて分類されている。そのため、ラビリンチュラ類の分類学的再編成が行われるなかで、ラビリンチュラ類であるか疑問視され

ている。また、淡水に生息しているディプロフリス [Diplophryidae] は *Diplophrys* 属から構成されている (Dykstra and Porter 1984)。細胞が鱗片で覆われていおり、細胞の2カ所から外質ネットのような構造が伸長している。ディプロフリス (Anderson and Cavalier-Smith 2012) とアンフィトレマ [Amphitremidae] (Takahashi et al. 2016), [Amphifilidae] (Gomaa et al. 2013), [Sorodiplophryidae] (Tice et al. 2016), 系統的位置が不明な [Stellarchytrium] (FioRito et al. 2016), [Elina] (Fuller 2001) は、ヤブレッツボカビ類と同じ特徴をもつが、ラビリンチュラ類とは異なるグループとして認識されている。

## 1.2.ヤブレッツボカビ類の現存量調査の方法

ヤブレッツボカビ類の現存量調査の方法としては、マツ花粉 MPN 法 [the most probable number method with pine pollen baiting : MPN] (Gaertner 1968) とアクリフラビン直接計数法 [acriflavine direct detection method : AfDD] (Raghukumar and Schaumann 1993) がある。近年では、ラビリンチュラ類の系統群ごとに特異的なプライマーを用いた定量 PCR [quantitative polymerase chain reaction : qPCR] によって、系統群ごとの現存量の推定が行われている (Nakai et al. 2013)。また、現存量調査はおこなわれていないものの、ヤブレッツボカビ類に特異的に染色する技術である蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション [fluorescence *in situ* hybridization : FISH] が開発されている (2003 年度甲南大学 卒業研究生 笹倉 侑香里氏 卒業研究, 2004 年度 甲南大学大学院 博士後期課程修了 高尾 祥丈氏 博士学位論文, Takao et al. 2007a)。

### 1.2.1.マツ花粉 MPN 法

マツ花粉 MPN 法は、1968 年に Gaertner によって開発された。ヤブレッツボカビ類の遊走細胞がマツ花粉へ走化性を示すことを利用したマツ花粉釣りえさ法と、作製した希釈系列を培養し、確立的に細胞密度を推定する MPN 法を組み合わせた方法である。

この方法は、海水サンプルの希釈系列を作製し、釣りえさであるマツ花粉を添加する。1 週間培養し、マツ花粉を寒天培地に塗布する。さらに 1 週間培養し、寒天培地上のヤブレッツボカビ類のコロニーの有無から、確率的にヤブレッツボカビ類の細胞密度を推定することができる。2つの方法は培養法であるため、生きているヤブレッツボカビ類のみの細胞密度を推定することができる。また、寒天培地上にヤブレッツボカビ類が出現するため、株を分離することができる。MPN

法は、希釈系列と各段階の本数によって、信頼性の高いデータを得ることができるとされている (Bongiorni and Dini 2002)。

マツ花粉 MPN 法は、ヤブレッツボカビ類がマツ花粉への走化性をもつこと、抗生物質を含む寒天培地上で増殖することが前提となる。そのため、マツ花粉へ付着していないヤブレッツボカビ類や寒天培地で増殖できないヤブレッツボカビ類が存在すると、細胞密度が過小評価されていることが指摘されている (Ueda et al. 2015)。また、培養期間を要するため、結果を得るまでに時間がかかる。

### 1.2.2.アクリフラビン直接計数法

アクリフラビン直接計数法は、1993年に Raghukumar and Schaumann によって開発された。蛍光色素であるアクリフラビン [acriflavine] で硫酸多糖を染色し、蛍光顕微鏡下で直接計数する方法である (Chamberlain 1980, Raghukumar and Schaumann 1993)。ヤブレッツボカビ類の細胞壁は硫酸多糖で構成されているためオレンジ-赤色に、核は黄-緑色に染色される。そのため、ヤブレッツボカビ類と他の生物を見分けることができる。

この方法は、培養法であるマツ花粉 MPN 法とは異なり、培養が困難なヤブレッツボカビ類を計数することが可能である。しかし、遊走細胞や細胞壁が薄いヤブレッツボカビ類は染色されにくいいため、計数できない (Raghukumar and Schaumann 1993)。さらに、ヤブレッツボカビ類を単離し、同定することもできない。

### 1.2.3.定量 PCR

定量 PCR は、PCR の増幅量をリアルタイムでモニタリングすることで DNA 量を定量する方法であり、迅速性と定量性に優れている。対象とする生物に特異的なプライマーやプローブを用いて DNA の増幅を行い、その蛍光強度をモニタリングすることで DNA 量の定量を行うことができる。これまでに、渦鞭毛藻類やツボカビなどの海洋微生物の現存量調査に適用されている (Bowers et al. 2000, Moorthi et al. 2006, Kirshtein et al. 2007, Lefèvre et al. 2010)。

ヤブレッツボカビ類の現存量調査にも定量 PCR が適用されている (Nakai et al. 2013)。7 属の特異的プライマー (*Aurantiochytrium*, *Botryochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia*) が設計され、鹿児島県西部

の<sup>こしき</sup>甑島，県南部の薩摩硫黄島，種子島，瀬戸内海，三陸の唐桑半島で採取した 212 の海水サンプルを対象に，定量 PCR で系統群ごとの細胞密度が推定された。定量 PCR では 8 サンプルのみからヤブレッツボカビ類が検出され，*Aurantiochytrium* と *Oblongichytrium* の細胞密度はそれぞれ  $1.12 \times 10^4 \sim 1.31 \times 10^4$  cells/L， $1.02 \times 10^4 \sim 3.14 \times 10^4$  cells/L であると推定された。しかしながら，同時に行われたアクリフラビン直接計数法では，104 サンプルからヤブレッツボカビ類が検出され，その細胞密度は  $1.37 \times 10^3 \sim 7.68 \times 10^4$  cells/L であると推定された。以上の結果が一致しなかったことは，夾雑物によって，定量 PCR における DNA の増幅反応が阻害されてしまうため，標的 DNA を検出することができなかったためと考えられた (Nakai et al. 2013)。また，アクリフラビン直接計数法の方が定量 PCR よりも推定された細胞密度が高かったことは，Collado-Mercado et al. (2010) で明らかになった新規ヤブレッツボカビ類の存在が影響していると推測されている (Nakai et al. 2013)。

#### 1.2.4. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (以下，FISH) は，対象とする生物の特異的な配列に，蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションさせ，特異的かつ高感度に検出する方法である。これまでに，バクテリアやアーケア，渦鞭毛藻類を特異的に検出するために有用であることが明らかにされている (Stahl et al. 1988, Amann et al. 1990, Ishii et al. 2004, Sako et al. 2004)。

ラビリンチュラ類，特にヤブレッツボカビ類の検出のための方法が開発されている (2003 年度 甲南大学 卒業研究生 笹倉 侑香里氏 卒業研究)。18S リボソーム RNA [18S ribosomal RNA: 18S rRNA] を標的としたプローブ 18S04FL，18S05FL，18S06FL を設計し，18S04FL は 1 つのクレードを，18S05FL，18S06FL はヤブレッツボカビ類のほぼすべての系統群を検出できると予想された。さらに，夙川河口で採取された野外サンプルに開発された FISH を適用した結果，ヤブレッツボカビ類と推測される細胞の蛍光が観察された。

#### 1.3. これまでのヤブレッツボカビ類の現存量調査

これまで，さまざまな海域でヤブレッツボカビ類の現存量調査が行われ，熱帯，亜熱帯のマングローブ域から極域，河口から外洋，表層から深海にまで，世界中の海洋に広く分布していること

が明らかになった (Ulken 1986, Kimura et al. 1999, Raghukumar et al. 2001, Bongiorno et al. 2004, Naganuma et al. 2006)。しかし、ヤブレッツボカビ類の年間を通じた細胞密度の変動や生態的に重要な系統群に関する情報は、ほとんどない状況であった。

そのような状況の中、夙川河口（河口域）と大阪湾（沿岸域）における、ヤブレッツボカビ類の細胞密度と構成系統群に関する継続的な調査が行われた (Ueda et al. 2015)。その結果、ヤブレッツボカビ・スパイク [thraustochytrid spike] とよばれる春から晩夏にかけてヤブレッツボカビ類の細胞密度の急激な増減が観測された。また、分離株の分子系統解析から、10の未同定または新規の系統群を含む27系統群が存在することが明らかとなった。河口域と沿岸域のそれぞれにおいて、比較的高頻度に出現する主要系統群 [major phylogenetic group] が異なることが明らかになった。河口域と沿岸域では、豊富な有機物の種類が異なることから、河口域のヤブレッツボカビ類は陸起源有機物を、沿岸域のヤブレッツボカビ類は植物プランクトンの死骸などの海洋由来のデトライトから栄養を摂取していると考えられた。さらに、河口域と沿岸域では季節によって出現する系統群が移り変わっていた。河口域では、unidentified thraustochytrid 1が春に、unidentified thraustochytrid 2aが初夏に、*Schizochytrium* sp.が夏から冬に、unidentified thraustochytrid 2bが夏に、*Oblongichytrium* sp. 1と2が夏以外の季節に、*Oblongichytrium* sp. 3が冬から春に出現した。また、沿岸域の主要系統群は、*Aplanochytrium* sp. が夏から秋にかけて、unidentified thraustochytrid 3bが春と秋から冬に出現した。このことからヤブレッツボカビ類は系統群ごとに、水温、塩分、栄養源などの環境要因によって棲み分けをしている可能性が示唆された。

#### 1.4. 極限環境下に生息するヤブレッツボカビ類

真核生物もしくはラビリントウモリ類に特異的なプライマーを用いたクローニングによって群集構造解析が行われている (Lopez-Garcia et al. 2001, Dawson et al. 2002, Edgcomb et al. 2002, Stoeck et al. 2003, 2006, 2007, Luo et al. 2005, Takishita et al. 2005, Behnke et al. 2006, Zuendorf et al. 2006)。その結果、熱水噴出孔や溶存酸素濃度が極端に少ない酸素極小層 [oxygen minimum zone: OMZ] など過酷な環境下で採取された環境 DNA から *Thraustochytrium* 系統群, *Oblongichytrium* 系統群, *Aplanochytrium* 系統群などのヤブレッツボカビ類と単一のクレードを形成する配列が検出されている (表 2-1)。また、ラビリントウモリ類特異的なプローブ (Lab-Y) を使用した CARD-FISH [Catalyzed Reporter Deposition-FISH] の結果、マリンスノーからヤブレッツボカビ類が検出されている (Bochdansky et al. 2017)。

特に、酸素極小層には生きたヤブレッツボカビ類が存在していることが確認されている。アラビア海の水深が 200~2000m の海域は溶存酸素濃度が極端に低く、亜硝酸塩が高濃度に蓄積している。しかしこのような極限環境下でも、マツ花粉 MPN 法とアクリフラビン直接計数法によって、採取した海水からヤブレッツボカビ類が検出されている (Raghukumar et al. 2001)。

### 1.5.ヤブレッツボカビ類の分解酵素活性

これまで、さまざまなヤブレッツボカビ類で分解酵素活性が調べられている (Raghukumar et al. 1994, Bremer 1995, Bremer and Talbot 1995, Bongiorno et al. 2005, Taoka et al. 2009, Kanchana et al. 2011, Nagano et al. 2011 ; 表 2-2) 。ヤブレッツボカビ類は、糖のグリコシド結合を加水分解する酵素であるアミラーゼ [amylase] , タンパク質やポリペプチドのペプチド結合を加水分解する酵素であるプロテアーゼ [proteinase] , ゼラチンタンパク質を加水分解する酵素であるゼラチナーゼ [gelatinase] , 尿素を加水分解する酵素であるウレアーゼ [urease] , 中性脂肪 (グリセロールエステル) のエステル結合を加水分解する酵素であるリパーゼ [lipase] , 糖の  $\alpha$  1-4-グリコシド結合を加水分解する酵素である  $\alpha$ -グルコシダーゼ [ $\alpha$ -glucosidase] , リン酸エステルやリン酸無水物 (ポリリン酸) を加水分解する酵素であるホスファターゼ [phosphatase] , キシランの  $\beta$  1-4 グリコシド結合を加水分解する酵素であるキシラーゼ [xylanase] , キチンの  $\beta$  1-4 グリコシド結合を分解する加水分解酵素であるキチナーゼ [chitinase] , ペクチン酸の  $\alpha$  1-4 ガラクツロニル結合を加水分解する酵素であるペクチナーゼ [pectinase] などさまざまな酵素を細胞外に分泌し、多くの細菌が分解できないような難分解性有機物を分解できる。

### 1.6.多様な生物に付着するヤブレッツボカビ類

ラビリンチュラ類は海水に浮遊しているだけでなく、海草、紅藻、緑藻、褐藻、珪藻、軟体動物などにも付着している (表 2-3) 。

狭義のラビリンチュラ類は、アマモ [*Zostera*] などの単子葉植物に感染し、衰弱病 [wasting disease] を引き起こす (Short et al. 1987, Ralph and Short 2002, Bigelow et al. 2005) 。衰弱病は、1930 年代の北アメリカとヨーロッパに大西洋沿岸で流行し、アマモが消滅するような事態が起こった (Cotton 1933, Blegvad 1934, Renn 1934, Milne and Milne 1951) 。

ヤブレッツボカビ類も多様な基質に付着しており、その多くは海草や紅藻、緑藻、褐藻などの大

型藻類である。例えば、海草のウミヒルモ属 [*Halophila*] に感染した *Aplanochytrium saliens* の観察が行われた (Quick 1974a)。健康なウミヒルモ属に *Aplanochytrium* が感染していないことから、非攻撃的であると推測されている。他にも、微細藻類である珪藻にヤブレッツボカビ類が付着している様子が観察されている (Gaertner 1979, Raghukumar 1986)。Gaertner (1979) は、ヤブレッツボカビ様生物が *Thalassiosira nordenskiöldii*, *Chaetoceros* sp., *Thalassionema nitzschioides* に付着し成長している様子を観察した。光学顕微鏡観察により、ヤブレッツボカビ様生物は *Schizochytrium* sp. と同定された。*Schizochytrium* と同定されたヤブレッツボカビ類様生物が成長するとともに、珪藻の細胞質が収縮したと報告した。また、Raghukumar (1986) は、光学顕微鏡観察によって *Ulkenia visurgensis* と同定されたヤブレッツボカビ様生物が、“瀕死の”珪藻 *Coscinodiscus*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Grammatophora*, *Melosira* に付着していたと報告した。

近年になって、分子学的手法で、サンゴ [*Favia*] にラビリンチュラ類が付着していることが報告されている。紅海で採取したサンゴの表面または内部の生物を、真核生物およびストラメノパイル生物群に特異的なプライマーを用いて DNA を増幅させ、クローニングを行った (Siboni et al. 2010)、その結果、配列が決定したクローン配列の 90% がラビリンチュラ類由来であることが示された。その主な系統群は *Aplanochytrium*, *Thraustochytrium*, *Labyrinthuloides* であった。

また、貝やタコなどの軟体動物に寄生したヤブレッツボカビ類も多く観察されている。例えば、Quahog Parasite Unknown (QPX) はホンビノスガイ [*Mercolaria mercenaria*] に寄生することから、病原生物として警戒されている (Whyte et al. 1994, Calvo et al. 1998)。また、*Aplanochytrium* はアワビ [*Haliotis kamtschalkan*] に寄生し、外質ネットがアワビの細胞内に侵入している様子が観察されている (Bower et al. 1989)。

### 1.7. ヤブレッツボカビ類の栄養摂取

ラビリンチュラ類が多く生息している海域の調査や、細胞密度とクロロフィル *a* 濃度や有機物との相関に関する調査によって、ヤブレッツボカビ類が何から栄養を摂取しているかが推測されている。1 つ目の報告は、1999 年に四万十川河口で行われた調査である (Kimura and Naganuma 2001)。河川水の影響を受けている海域での細胞密度の平均は  $3.5 \times 10^3$  cells/L、河川水の影響を受けていない海域での平均細胞密度は  $1.8 \times 10^3$  cells/L と推定された。河川水の影響を受けている海域の方がヤブレッツボカビ類の細胞密度が高いことから、ヤブレッツボカビ類は陸起源有機物から栄養を摂取している可能性を示唆した。2 つ目の報告は、夙川河口で行わ

れた調査であり、ヤブレッツボカビ類の細胞密度は、ヤブレッツボカビ類の細胞密度の平均は 4,670 cells/L であると推定された (Ueda et al. 2015)。また、ヤブレッツボカビ類の細胞密度はクロロフィル濃度と相関が低く、懸濁態有機物 [particulate organic matter : POM] とは相関が高いことから、ヤブレッツボカビ類がデトライタスや陸起源有機物を栄養源としていることを示唆した。

一方で、ヤブレッツボカビ類とクロロフィル *a* 濃度に正の相関があるという報告もある。

1 つ目の報告は、1997 年と 2000 年に瀬戸内海で調査が行われ (Naganuma et al. 1998, Kimura et al. 2001)。ヤブレッツボカビ類の細胞密度の平均は、それぞれ、 $1.03 \times 10^4$  cells/L、 $3.11 \times 10^3$  cells/L であると推定され、細胞密度はクロロフィル濃度と正の相関があることを示した。2 つ目の報告は、1993 から 1996 年に行われたアラビア海における調査においても、ヤブレッツボカビ類の細胞密度はクロロフィル *a* 濃度と正の相関があることが示されている (Raghukumar et al. 2001)。また、ハワイ沖におけるヤブレッツボカビ類の現存量調査の結果、最大濃度のクロロフィルを含む層にはヤブレッツボカビ類が豊富に生息していることが明らかになった (Li et al. 2013)。

しかしながら、ヤブレッツボカビ類が環境中で何から栄養を摂取しているのか、どのような方法で栄養を摂取しているのかは本研究が行われるまでは明らかになっていなかった。

## 1.8.高度不飽和脂肪酸やカロテノイドの合成

ラビリンチュラ類は増殖速度が速いことから、産業利用へ向けた取り組みが活発である。これまでに、ラビリンチュラ類に脂肪酸を効率よく、かつ大量に合成・蓄積させるために、新しい株の取得 (Nakazawa et al. 2012a, 2014)、培養条件の検討 (Nakahara et al. 1996, Yokochi et al. 1998, Lewis et al. 1999, Bajpai et al. 1991a, b, Matsuura et al. 2012, Nakazawa et al. 2012b)、遺伝子導入などによる分子育種 (Sakaguchi et al. 2012, Yan et al. 2013, Ren et al. 2015) などが行われている。

海産魚類は、必要十分なドコサヘキサエン酸 [docosahexaenoic acid : 以下, DHA] やエイコサペンタエン酸 [eicosapentaenoic acid : 以下, EPA] などの高度不飽和脂肪酸を体内で合成できないと考えられている (Bell and Tocher 2009)。そのため、海産魚類を養殖する現場では、仔魚の飼料として人工配合飼料に加えてワムシやアルテミアを与えている。このワムシの飼料として DHA を豊富にもつヤブレッツボカビ類を利用する研究が行われおり、ワムシの栄養強化に成功している (Barclay and Zeller 1996, Hayashi et al. 2007, Song et al. 2007, Yamasaki et al. 2007, Estudillo-del Castillo et al. 2009)。また、ヤブレッツボカビ類によっ

て栄養強化したワムシを与えた 仔魚の生存率の上昇も確認されている (Izquierdo et al. 1989, Watanabe et al. 1989a, b, Yoshimatsu et al. 1997)。

また、ヤブレッツボカビ類は抗酸化物質であるカロテノイド、アスタキサンチン [astaxanthin]、フェニコキサンチン [phoenicoxanthin]、カンタキサンチン [canthaxanthin]、エキネノン [echinenone]、 $\beta$ -カロテン [ $\beta$ -carotene]などを合成できることが報告されている (Valadon 1976, Aki et al. 2003, Carmona et al. 2003, Yamaoka et al. 2004, Yokoyama et al. 2007, Yokoyama and Honda 2007)。特に、カロテノイドの組成や量は系統群によって異なるため、分類学的形質として利用されることもある (Yokoyama et al. 2007, Yokoyama and Honda 2007)。

### 1.9.ヤブレッツボカビ類と動物プランクトン

ヤブレッツボカビ類は、インド洋や北太平洋から採取したカイアシ類 [copepod] やサルパ類 [salpa]の消化管や糞便ペレットから検出されている (Raghukumar and Raghukumar 1999, Damare and Raghukumar 2006, 2010, Hirai et al. 2018)。近年では、次世代シーケンサー解析によって *Calanus sinicus* の消化管内容物から *Aplanochytrium* が検出された (Hirai et al. 2018)。*C. sinicus* は亜熱帯西部北太平洋の沿岸水域に広く生息する大型カイアシ類であり、動物プランクトンの現存量の大部分を占めるとされている (Hulsemann 1994, Chihara and Murano 1997)。この研究から、*Aplanochytrium* は沿岸域で重要なカイアシ類の主要な餌である可能性が示された。さらに、全生物に対する *Aplanochytrium* のリード数の割合が環境サンプルよりも消化管内容物の方が高いことから、*C. sinicus* が *Aplanochytrium* を積極的に餌として選択していることが示唆された。

## 2.原生生物に関する知見

### 2.1.原生生物の高度不飽和脂肪酸

これまでに、真眼点藻類 [Eustigmatophyceae] , クリプト藻 [Cryptophyceae] , 珪藻 [Bacillariophyceae] , プラシノ藻 [Prasinophyceae] , 褐藻 [Pheophyceae] , 紅藻 [Rhodophyceae] , コケ植物 [Bryophyta] , グロムス門 [Glomeromycota] , 接合菌 [Zygomycota] , ガンマプロテオバクテリア [Gamma Proteobacteria] , 渦鞭毛藻類 [Dinophyceae] , ハプト藻 [Haptophyceae] , ピンギオ藻 [Pinguiphyceae] を含むさまざまな生物群の脂肪酸組成が調べられている (Brown 1997, Delong and Yayanos 1986, Yongmanitchai and Ward 1989, Zhukova and Aizdaicher 1995, Mansour et al. 1999, Russell and Nichols 1999, Kawachi et al. 2002, Pratoomyot et al. 2005, Chu et al. 2008, Chen et al. 2012, Gladyshev et al. 2013) 。その中でも、渦鞭毛藻類、ハプト藻は EPA より DHA をより高濃度に蓄積している。

### 3.海洋生態系

#### 3.1.生食連鎖と腐食連鎖

海洋生態系では、一次生産者である植物プランクトンが、無機塩類を利用して水中の二酸化炭素を固定するという光合成を行う。一次生産者は、植物食性動物プランクトン [herbivorous net-zooplankton] に捕食され、さらに植物食性動物プランクトンは、動物食性動物プランクトン [carnivorous net-zooplankton] やプランクトン食性魚類 [planktivorous fish] に捕食されるという生食連鎖 [grazing food chain] が古くから認識されている (Steele 1974)。

海洋生態系には、生物の死骸や排泄物、陸起源有機物などの有機物が存在している。有機物は従属栄養細菌によって分解され、従属栄養細菌は原生生物に消費されることで生食連鎖に組み込まれるという微生物ループ [microbial loop] の概念が Azam et al. (1983) によって示された。その後の研究によって、微生物ループが、海洋の物質循環に重要な役割を担っていることが明らかになった (Porter et al. 1985, Fenchel 1988, 2008, Lampert and Sommer 1997, Pomeroy et al. 2007)。従属栄養細菌によって分解された有機物は無機塩類となり、植物プランクトンによって光合成に利用される。このように、海洋生態系における有機物の分解者として、主に認識されている従属栄養細菌を起点とした微生物ループが重要であると理解されている。

#### 3.2.海洋生態系の基本概念

ある時点に任意の空間内に存在する生物体の量を、重量もしくはエネルギー量で示した指標を現存量 [standing stock] もしくはバイオマス [biomass] という。また、現存量が生産される速度のことを生産速度 [production rate] という。一般的に、生産速度は、炭素量を面積もしくは体積と時間で割った数値で表現される。例えば、1年間に  $1 \text{ m}^2$  あたりに生産された生産速度は、 $\text{g C/m}^2/\text{yr}$  と表現される。

#### 3.3.生物のサイズと被食-捕食の関係

海洋に生息するプランクトンは、サイズによって、ピコプランクトン [picoplankton;  $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ ]、ナノプランクトン [nanoplankton;  $2 \sim 20 \mu\text{m}$ ]、マイクロプランクトン [microplankton;  $20 \sim 2 \times 10^2 \mu\text{m}$ ]、メソプランクトン [mesoplankton;  $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^3$

$\mu\text{m}$ ] に分類される (Sieburth 1978, Fenchel 1988, 図 2)。ピコプランクトンには従属栄養細菌やシアノバクテリア [cyanobacteria] が、ナノプランクトンには従属栄養鞭毛虫や光合成鞭毛虫が、マイクロプランクトンには珪藻、光合成渦鞭毛藻類、繊毛虫 [ciliate]、放射虫 [radiolaria] や有孔虫 [foraminifera] が、メソプランクトンには、カイアシ類、ミジンコ類 [cladocera]、輪形動物 [rotifera] を含む大型の従属栄養原生動物、底生性の脊椎動物の幼生などが含まれる。一部の繊毛虫が  $20 \mu\text{m}$  より小型であること、従属栄養性渦鞭毛藻類はナノ、マイクロ、メソプランクトンのすべてに含まれることなど、いくつかの例外がある。しかしながら、サイズによる分類は、原生物を理解するうえで重要な枠組みであるとされている (Fenchel 1988)。

また、被食者と捕食者のサイズの比はおおよそ 1:10 であり (Fenchel 1988)、栄養段階 [trophic level] が 1 段階上がるごとに捕食者の大きさが餌生物よりおおよそ 1 桁大きくなる (Fenchel 1988, 図 2-2)。さらに、取り込んだエネルギーのうち、実際に成長に使われるエネルギーの割合を転送効率 [transfer efficiency] という。低次栄養段階の生物は、高次栄養段階の生物に消費されるたびにエネルギーを損失するため、高次栄養段階の生物、すなわちサイズが大きい生物の方が、生食連鎖の頂点の生物に効率よくエネルギーが転送される。

### 3.4.瀬戸内海における炭素循環

1993 年から 1994 年にかけて、瀬戸内海におけるプランクトンの調査が行われ、バクテリア [bacteria]、植物プランクトン、微小動物プランクトン [macrozooplankton]、植物食性動物プランクトン、動物食性動物プランクトン、プランクトン食性魚類 [planktivorous fish] の現存量や生産速度などが推定された (Uye et al. 1996, Hashimoto et al. 1997, Naganuma and Miura 1997, Uye and Shimazu 1997)。

調査の結果、瀬戸内海に生息する微小動物プランクトンの生産速度は、1 年間に  $1 \text{ m}^2$  あたり  $29.2 \text{ g}$  と推定された。微小動物プランクトンの成長効率 [growth efficiency] を 40% とすると、微小動物プランクトンは 1 年間に  $1 \text{ m}^2$  あたりに  $72.9 \text{ g}$  の炭素を消費すると推測された (Uye et al. 1996)。また、微小動物プランクトンが消費する炭素は、植物プランクトンや従属栄養性鞭毛虫、バクテリアによって生産されていると考えられた。同様に、植物食性動物プランクトンと動物食性動物プランクトンによって、1 年間に  $1 \text{ m}^2$  あたりにそれぞれ  $172.0 \text{ g}$ 、 $66.4 \text{ g}$  の炭素が消費されており、その炭素は植物プランクトンや微小動物プランクトン、微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンが生産していると推測された (Uye et al. 1996, Uye and Shimazu 1997)。

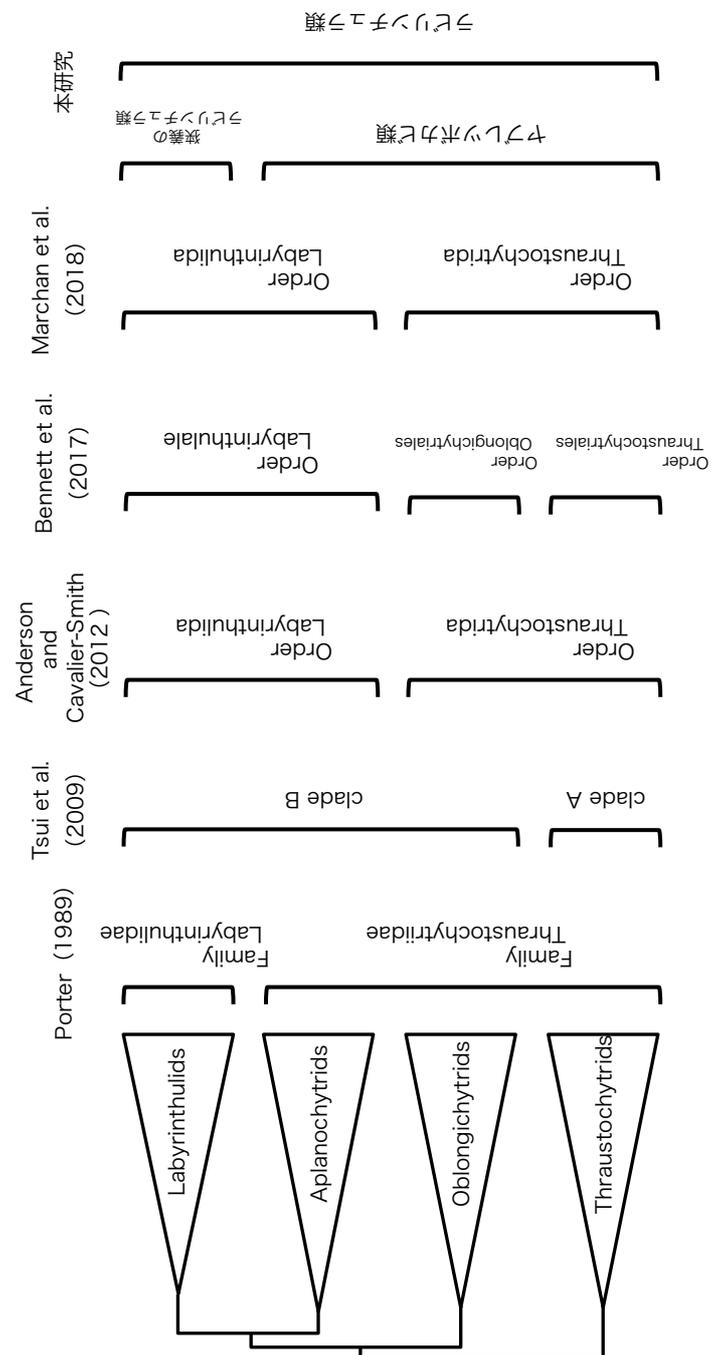


図2-1.ラビリンチュラ類の分類

狭義のヤブレッツボカビ類, アプラノキトリウム類, オブロンギキトリウム類, 狭義のラビリンチュラ類の少なくとも4つの系統群から構成される。

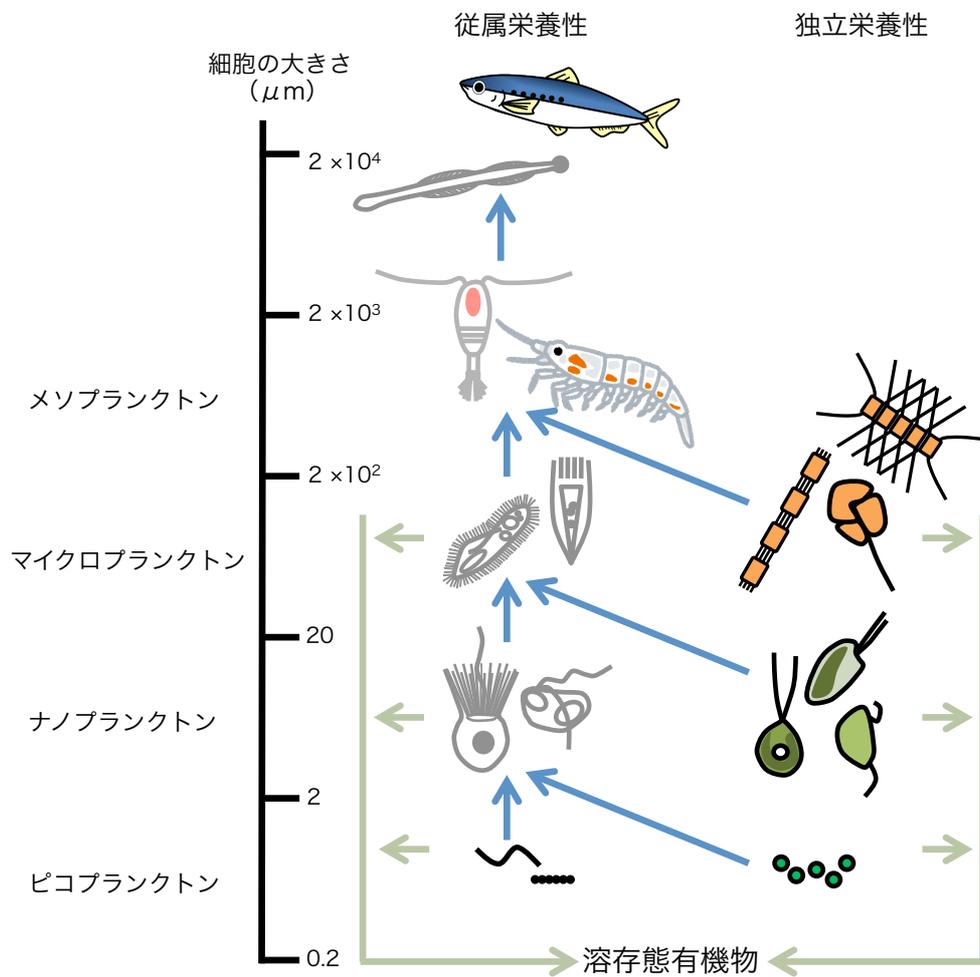


図2-2.海洋生態系における生食連鎖と微生物ループ (Fenchel 1988 改変)

海洋に生息するプランクトンは、サイズによって、ピコプランクトン、ナノプランクトン、マイクロプランクトン、メソプランクトンに分類される。

また、被食者と捕食者のサイズの比はおよそ1:10であり、栄養段階が1段階上がることに捕食者の大きさが餌生物よりおよそ1桁大きくなる。

表2-1.極限環境下で採取した環境 DNAから検出されたラビリントラ類

環境	サンプリング地点	サンプル	生物群	引用文献
無光層	Antarctic polar front	海水 (水深2,000m)	Labyrinthulids Thraustochytrids	Lopez-Garcia et al. (2001)
熱水噴出口	Guaymas Basin, California, Mexico	堆積物 海水	ラビリントラ類	Edgcomb et al. (2002)
無酸素水域		堆積物	Labyrinthuloides	Dawson et al. (2002)
無酸素水域	Cariaco Basin, Caribbean Sea	海水 (水深270m, 340m)	Labyrinthulida	Stoeck et al. (2003)
無酸素水域 高溶解硫化物濃度	Zodletone Mountain, Anadarko basin	微生物マット	Labyrinthulida ( <i>Aplanochytrium kerguelense</i> )	Luo et al. (2005)
無酸素	Fukuyama in Kagoshima Bay	土壌	Labyrinthulida	Takishita et al. (2005)
酸性/無酸素界面	Cariaco Basin, Caribbean Sea	海水 (水深340m)	Labyrinthulides	Stoeck et al. (2006)
無酸素水域	Mariager Fjord, Arctic ocean	海水 (水深18 m)	Labyrinthulida	Zuendorf et al. (2006)
熱水噴出口 無酸素水域	Unqussivik, Disko Island, Greenland	堆積物	Labyrinthulida	Stoeck et al. (2007)

表2-2.ヤブレッツボカビ類の酵素活性

株名	株番号	酵素	酵素活性	引用文献
<b>Aplanochytrium</b>				
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	SEK 535	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Aurantiochytrium</b>				
		ウレアーゼ	+	
		プロテアーゼ	+	
		ホスファターゼ	+	
		リパーゼ	+	
	ATCC MYA-1381	$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	Taoka et al. (2009)
		アミラーゼ	-	
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>		キシナーゼ	-	
		ゼラチナーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
	mh0186	セルラーゼ	-	Nagano et al. (2011)
	SR21	セルラーゼ	-	Nagano et al. (2011)
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	SEK 218	セルラーゼ	-	Nagano et al. (2011)
	SEK 243	セルラーゼ	-	Nagano et al. (2011)
		アミラーゼ	+	
		キシナーゼ	+	
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>		セルラーゼ	+	Raghukumar et al. (1994)
		プロテアーゼ	+	
		ペクチンリアーゼ	+	
		ポリガラクトツロナーゼ	+	
	ATCC 20888	セルラーゼ	-	Nagano et al. (2011)
		ウレアーゼ	+	
		プロテアーゼ	+	
		ホスファターゼ	+	
		リパーゼ	+	
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	mh0186	$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	Taoka et al. (2009)
		アミラーゼ	-	
		キシナーゼ	-	
		ゼラチナーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
<b>Botryochytrium</b>				
<i>Botryochytrium radiatum</i>	SEK 353	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Oblongichytrium</b>				
<i>Oblongichytrium</i> sp.	SEK 347	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Parietichytrium</b>				
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	SEK 351	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
	SEK 364	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Schizochytrium</b>				
		セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
		ウレアーゼ	+	
		ゼラチナーゼ	+	
		プロテアーゼ	+	
	ATCC 28209	ホスファターゼ	+	Taoka et al. (2009)
		リパーゼ	+	
		$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	
		アミラーゼ	-	
		キシナーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
		セルラーゼ	+	Bremer (1995)
		セルラーゼ	+	Bremer and Talbot (1995)
<i>Schizochytrium</i> sp.	SEK 210	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
	SEK 345	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<i>Sicyoidochytrium minutum</i>	SEK 355	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Sicyoidochytrium</b>				
<i>Sicyoidochytrium</i> sp.	SEK 356	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<b>Thraustochytrium</b>				
		セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
		アミラーゼ	+	
		ウレアーゼ	+	
		ゼラチナーゼ	+	
		プロテアーゼ	+	
<i>Thraustochytrium aureum</i>	ATCC 34304	ホスファターゼ	+	Taoka et al. (2009)
		リパーゼ	+	
		$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	
		キシナーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
		セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
		アミラーゼ	+	
		ウレアーゼ	+	
		ゼラチナーゼ	+	
<i>Thraustochytrium roseum</i>	ATCC 28210	プロテアーゼ	+	Taoka et al. (2009)
		ホスファターゼ	+	
		リパーゼ	+	
		$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	
		キシナーゼ	-	
		セルラーゼ	-	
<i>Thraustochytrium</i> sp.	ATCC pra-295	アルカリリパーゼ	+	Kanchana et al. (2011)
	ATCC pra-296	アルカリリパーゼ	+	
		アミラーゼ	+	
		ウレアーゼ	+	
		キシナーゼ	+	
		ゼラチナーゼ	+	
<i>Thraustochytrium striatum</i>	ATCC 24473	プロテアーゼ	+	Taoka et al. (2009)
		ホスファターゼ	+	
		リパーゼ	+	
		$\alpha$ -グルコシダーゼ	+	
		セルラーゼ	-	
<b>Ulkenia</b>				
<i>Ulkenia amoeboides</i>	SEK 214	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)
<i>Ulkenia</i> sp.	ATCC 28207	セルラーゼ	+	Nagano et al. (2011)

+: 酵素活性あり, -: 酵素活性なし

表2-3.ラビリンチュラ類が付着するさまざまな基質

基質	ラビリンチュラ類	引用文献
アマモ [Eelgrass]		
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula</i> sp.	Pokorny (1967)
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula</i> sp. <i>Labyrinthula zosterae</i>	Quick (1974a)
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula</i>	Short et al. (1987)
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula</i> sp.	Muehlstein et al. (1988)
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula zosterae</i>	Short et al. (1993)
<i>Zostera marina</i> , <i>Heterozostera tasmanica</i>	<i>Labyrinthula</i> spp.	Vergeer and den Hartog (1994)
<i>Zostera marina</i>	<i>Labyrinthula zosterae</i>	Ralph and Short (2002)
褐藻 [Brown alga]		
<i>Sargassum</i> sp.	<i>Aplanochytrium kerguelensis</i>	Quick (1974b)
<i>Fucus serratus</i>	Thraustochytrid	Miller and Jones (1983)
sargasso weed	<i>Aplanochytrium</i> sp.	Ulken et al. (1985)
<i>Lobophora variegata</i>	<i>Labyrinthula</i> sp.	Raghukumar (1987)
<i>Sargassum cinereum</i> , <i>Padina tetrastomatica</i>	<i>Schizochytrium</i> sp., <i>Aplanochytrium minutum</i>	Raghukumar et al. (1992)
<i>Sargassum cinereum</i>	<i>Aplanochytrium minutum</i>	Sathe-Pathak et al. (1993)
<i>Sargassum cinereum</i>	<i>Ulkenia visuragensis</i> , <i>Aplanochytrium minutum</i>	Sharma et al. (1994)
緑藻 [Green alga]		
<i>Cladophora</i> , <i>Rhizoclonium</i> <i>Chaetomorpha media</i> , <i>Cladophora</i> sp., <i>Rhizoclonium</i> sp.	<i>Labyrinthula</i> sp.	Raghukumar (1986a) , Ramaiah (2006)
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Aplanochytrium minutum</i>	Watson and Raper (1957)
<i>Urospora</i> sp.	<i>Aplanochytrium stocchini</i>	Moro et al. (2003)
紅藻 [Red alga]		
<i>Gelidium pusillum</i>	<i>Schizochytrium</i> sp., <i>Aplanochytrium minutum</i>	Raghukumar et al. (1992)
<i>Laurencia</i> sp.	<i>Labyrinthula</i> sp.	Raghukumar (1987)
微細藻類		
<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Labyrinthula</i> sp.	Raghukumar (1987)
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	<i>Schizochytrium</i> sp.	Gaertner (1979)
<i>Coscinodiscus</i> sp. <i>Navicula</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp. <i>Grammatophora</i> sp. <i>Melosira</i> sp.	<i>Ulkenia visuragensis</i>	Raghukumar (1986b)
海草 [Sea grass ]		
<i>Halophila engelmannii</i>	<i>Aplanochytrium saliens</i>	Quick (1974a)
<i>Halodule wrightii</i>	<i>Aplanochytrium schizochytryps</i>	Quick (1974b)
<i>Posidonia oceanica</i> <i>Halodule uninervis</i> <i>Cymodocea nodosa</i> <i>Syringodium isoetifolium</i> <i>Syringodium isoetifolium</i> <i>Thalassodendron ciliatum</i> <i>Ruppia cirrhosa</i> <i>Thalassia testudinum</i> <i>Halophila ovalis</i>	<i>Labyrinthula</i> spp.	Vergeer and den Hartog (1994)
植物		
<i>Rhizophora apiculata</i> Blume	<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> <i>Schizochytrium aggregatum</i>	Raghukumar et al. (1994) Bremer (1995)
<i>Kandelia candel</i>	Thraustochytrid <i>Labyrinthula terrestris</i>	Wong et al. (2005) Bigelow et al. (2005)
無脊椎動物		
<i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Ruditapes decussatus</i> copepods <i>Mercenaria mercenaria</i>	QPX (Quahaug Parasite X) Thraustochytrid <i>Aplanochytrium kerguelense</i> QPX (Quahaug Parasite X)	Calvo et al. (1998) Azevedo and Corral (1997) Damare and Raghukumar (2010) Whyte et al. (1994)
<i>Favia</i> sp.	<i>Aplanochytrium</i> sp., <i>Thraustochytrium</i> sp., <i>Labyrinthuloides</i> sp.	Siboni et al. (2010)
<i>Eledone cirrhosa</i> <i>Macrostomum lignano</i> <i>Pegea confoederata</i>	Thraustochytrid <i>Thraustochytrium caudivorum</i> Thraustochytrid	Polglase (1980) Schärer et al. (2007) Raghukumar and Raghukumar (1999)

### 第3章

## ヤブレッツボカビ類の珪藻からの栄養摂取の観察

## 1.材料と方法

本研究では、培養実験によって、ヤブレッツボカビ類が何から栄養を摂取しているかを明らかにすることを目的とした。まず、珪藻との二員培養を行うことで、ヤブレッツボカビ類が珪藻から栄養を摂取するか検討を行った。

### 1.1.使用した株と継代培養

珪藻からの栄養摂取に関する実験に使用した株を表 3-1 に示す。

*Aplanochytrium* sp.(SEK717, SEK754, SEK758), *Oblongichytrium* sp. 1b (SEK710), *Ulkenia* sp. (SEK689), unidentified thraustochytrid 3c (SEK702) は、2011 から 2013 年にかけて瀬戸内海の東端に位置する大阪湾で行われたサンプリング調査において採取した海水サンプルから分離された (Ueda et al. 2015)。

*Aurantiochytrium* sp.2 (SEK605), *Thraustochytrium* aff. *kinnei*(SEK618), unidentified thraustochytrid 1 (SEK691), unidentified thraustochytrid 2a (SEK694) は、2008 から 2013 年にかけて兵庫県西宮市の夙川で行われたサンプリング調査において採取した海水サンプルから分離された (Ueda et al. 2015)。*Aplanochytrium* sp. (SEK602) は、2008 から 2011 年にかけて大阪湾上の人工島である六甲アイランドの南岸で行われたサンプリング調査において採取した海水サンプルから分離された (Ueda et al. 2015)。*Aurantiochytrium* sp.2 (N1-27) は、茨城県で採取した海水サンプルから分離された (Huang et al. 2003)。*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107) は Kultursammlung Mariner Pilze Bremerhaven, *Schizochytrium aggrigatum* (ATCC28209) は American Type Culture Collection より分譲された。*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107), *Aurantiochytrium* sp.2 (SEK605, N1-27), *Oblongichytrium* sp.1b (SEK710), *S. aggrigatum* (ATCC28209), *T. kinnei* (SEK618), *Ulkenia* sp. (SEK689), unidentified thraustochytrid 1 (SEK691), unidentified thraustochytrid 2a (SEK694), unidentified thraustochytrid 3c (SEK702) は、d-GPY 液体培地 [0.2% グルコース, 0.1%ポリペプトン, 0.05% 乾燥酵母エキスを, 50/50 自然海水/蒸留水に溶解; 表 3-2 A], *Aplanochytrium* sp. (SEK602, SEK 717, SEK 754, SEK 758) は SeaAct Medium 液体培地 (株式会社シー・アクト; 表 3-2 B) で継代培養を行った。

*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES-324), *Chaetoceros setoensis* (NIES-3712) は国立環境研究所より分譲され、f/2 液体培地 (Guillard and Ryther 1962, 表 3-3) で継代培養を行った。

## 1.2.二員培養

最初に、珪藻との二員培養を行うことで、ヤブレツボカビ類が珪藻から栄養を摂取するか検討を行った。ヤブレツボカビ類は夙川河口や大阪湾の主要系統群を含む9属14株を選択した(表3-1)。珪藻は世界中の海洋に広く分布し、夙川河口や大阪湾、六甲アイランドでもほぼ1年間を通して観察される *Skeletonema* 株と *Chaetoceros* 株を選択した(2010年度 甲南大学大学院 修士課程修了 上田 真由美氏 修士論文, Leblanc et al. 2012, Yamada et al. 2014)。

ヤブレツボカビ類の栄養源である培地を二員培養の培地に持ち込まないように、ヤブレツボカビ類を f/2 培地で洗浄した。また、ヤブレツボカビ類が珪藻に着生しやすいように、遊走細胞を形成する系統群は、遊走細胞を接種した。

まず、2週間の前培養を行った珪藻を f/2 培地で洗浄し、f/2 培地に懸濁した。次に、ヤブレツボカビ類の細胞を用意した。*Aurantiochytrium* sp.2 (SEK605, N1-27), *Oblongichytrium* sp.1b (SEK710), *S. aggregatum* (ATCC28209), *T. kinnei* (SEK618), *Ulkenia* sp. (SEK689), unidentified thraustochytrid 2a (SEK694), unidentified thraustochytrid 3c (SEK702) は遊走細胞を形成する系統群であるため、遊走細胞を珪藻に接種した。まず、d-GPY 液体培地で1週間の前培養を行ったヤブレツボカビ類の栄養細胞を d-GPY 寒天プレート上に広げ、20°Cまたは25°Cで1~2日間培養した。コロニーを形成していることを確認したのち、滅菌海水を寒天プレートに加え、数時間培養して遊走細胞を誘導した。*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107), *Aplanochytrium* sp. (SEK602, SEK 717, SEK 754, SEK 758) と unidentified thraustochytrid 1 (SEK691) は遊走細胞を形成しない系統群であるため、栄養細胞を珪藻に接種した。*Aplanochytrium* は SeaAct Medium 液体培地、unidentified thraustochytrid 1 は d-GPY 液体培地で1週間の前培養を行った。栄養細胞を回収、f/2 培地で洗浄した。最後に、ヤブレツボカビ類の遊走細胞または栄養細胞を、f/2 培地に懸濁した珪藻に接種した。ヤブレツボカビ類と *Skeletonema* の細胞数を比較することで、ヤブレツボカビ類が *Skeletonema* から栄養を摂取するかを検討した。細胞数の計数には、Fuchs-Rosenthal 血球計数板(ミナトメディカル株式会社)を用い、微分干渉顕微鏡(BX60, Olympus)を使用した。反復数は3で行った。本研究では、褐色の葉緑体をもつ細胞を“生きている”細胞、収縮した葉緑体をもつ細胞、もしくは葉緑体をもたない細胞を“死んだ”細胞であると判断した。

後述するように、*Aplanochytrium* が *Skeletonema* から栄養を摂取することが明らかになった。そこで、どのような状態の珪藻から栄養を摂取するかを検討するため、二員培養と単独培養での *A. kerguelense*(KMPB N-BA-107)と *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex(NIES-

324) の細胞数を経時的に計数し、二員培養と単独培養で比較を行った。

### 1.3.別府フラスコによる分解酵素と分解産物の影響の検討

ヤブレツボカビ類は分解酵素を細胞外に分泌することが報告されている(表 2-2)。また、海洋細菌である *Pseudoalteromonas* はプロテアーゼと DNase を含む殺藻物質を分泌し、珪藻を死滅させる (Lee et al. 2000)。そこで、*A. kerguelense* (KMPB N-BA-107) が分泌する酵素や殺藻物質による *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES-324) への影響を検討するために、別府フラスコ (Nippon Pall Corporation ; Ohno et al. 1999) を使用した培養実験を行った。

別府フラスコはメンブレンフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) で 2 つの空間 (以下、区画) に分けられている。一方の区画に接種された生物は、もう一方の区画に接種された生物と接触はできないが、培地の交換はできるような構造になっている。これまでと同様の方法で、別府フラスコのそれぞれの区画に *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養を行った。この実験において培養した *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の組み合わせは結果に示す。反復数は 3 で行い、統計学的分析は Microsoft Excel software (Microsoft Corporation) を使用して、スチューデントの t-検定 [Student t-test] を行った。

### 1.4.光学顕微鏡による二員培養の観察

後述するように、*Aplanochytrium* は *Skeletonema* に接触することで栄養を摂取している可能性が示された。そこで、どのようにして珪藻から栄養を摂取するかを観察するため、光学顕微鏡で、*Aplanochytrium* (SEK717) が *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES-324) と *Chaetoceros setoensis* (NIES-3712) から栄養を摂取する様子を観察した。

これまでと同様の方法で、*Aplanochytrium* と珪藻の二員培養を行った。光学顕微鏡観察には、微分干渉顕微鏡 (BX60) を使用し、顕微鏡デジタルカメラ (AxioCam HRc カメラ, Carl Zeiss) で撮影した。連続観察には、微分干渉顕微鏡 (Axiovert 200 DIC, Carl Zeiss) を使用し、顕微鏡デジタルカメラ (MC170 カメラ, Leica) を用いて画像を取得した。

### 1.5.走査型電子顕微鏡による二員培養の観察

後述するように、*Aplanochytrium* は外質ネットによって *Skeletonema* に接触することで栄養を摂取していることが明らかになった。そこで、外質ネットと *Skeletonema* を詳細に観察するため、走査型電子顕微鏡 [scanning electron microscopy : SEM] で、*Aplanochytrium* (SEK717) が *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES-324) から栄養を摂取する様子を観察した。

これまでと同様の方法で、*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養を行った。二員培養のサンプルを、最終濃度がそれぞれ 0.1 M カコジル酸緩衝液中の 2.5% (v/v) グルタルアルデヒドおよび 0.1 M スクロースになるように、一次固定を行った。サンプルを日本電子 株式会社に送付し、二次固定および脱水・乾燥処理を依頼した。最終濃度が 1.5% (v/v)  $\text{OsO}_4$  で二次固定を行った。次に、エタノールシリーズで脱水し、続いて酢酸イソアミルで置換し、 $\text{CO}_2$  臨界点法により脱水・乾燥処理を行った。 $\text{OsO}_4$  コーティングを施し、走査型電子顕微鏡 (JSM-7200F, JEOL) で観察を行った。

## 2.結果

### 2.1.系統群ごとの栄養摂取能の比較

ヤブレツボカビ類が珪藻から栄養を摂取するか検討するため、ヤブレツボカビ類 9 属 14 株と *Skeletonema* の二員培養を行った。事前に、藻類の培地である f/2 培地では、ヤブレツボカビ類単独培養はほとんど細胞数が増加しないことを確認した。図 3-1 に、培養 10 日目の二員培養下のヤブレツボカビ類および *Skeletonema* の細胞数を示す。系統群によって、珪藻からの栄養摂取能に大きな差があることが明らかとなった。中でも、*Aplanochytrium* の細胞数は他の系統群より有意に多く、珪藻からの栄養摂取能が高いことが示された。一方、*Aplanochytrium* を以外の他の系統群は、ヤブレツボカビ類の細胞数はほとんど増加しなかったことから、*Skeletonema* から栄養摂取することはできないことが示された。

### 2.2.二員培養の経時的な観察

*Aplanochytrium* がどのような状態の *Skeletonema* から栄養を摂取しているかを明らかにするために、*Skeletonema* 単独培養、*Aplanochytrium* 単独培養、二員培養について、それぞれ *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の細胞数を経時的に計数した。

*Skeletonema* 単独培養では、培養開始から培養 6 日目までは *Skeletonema* が増加し [対数増殖期：logarithmic growth phase]，その後、細胞数は一定になった [定常期：stationary phase] (図 3-2 a)。*Aplanochytrium* 単独培養では、細胞数はほとんど増加しなかった (図 3-2 c)。*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養では、*Skeletonema* の細胞数はほとんど増加せず、一方の *Aplanochytrium* の細胞数は対数的に増加した (図 3-2 b)。

以上のことから、*Aplanochytrium* は生きている *Skeletonema* から栄養を摂取することで、増殖していることが示された。

### 2.3.別府フラスコによる分解酵素と分解産物の影響の検討

*Aplanochytrium* の栄養接種様式として、以下のような仮説を立てた。まず、*Aplanochytrium* が珪藻と接触することで分解酵素や殺藻物質を細胞外に分泌する。分泌された分解酵素や殺藻物質は珪藻を分解し、分解産物が生じる。*Aplanochytrium* は珪藻の分解産物を摂取する。この

仮説を検証するために、別府フラスコを使用し、分解酵素が細胞外に分泌されているかを検討した。

*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の単独培養、二員培養をそれぞれ行い、これまでと同様の結果が得られた (図 3-3 a, b, c)。このことから、別府フラスコによる *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の増殖に対する影響はないことが示された。

次に、*Aplanochytrium* と *Skeletonema* を 2 つの区画でそれぞれ培養した。その結果、*Aplanochytrium* の細胞数ほとんど増加せず、*Skeletonema* の細胞数は増加した (図 3-3 d)。このことから、*Aplanochytrium* は分解酵素や殺藻物質を細胞外に分泌していない、あるいは、分泌している場合でも、*Skeletonema* に影響のある濃度に達していないことが示された。また、*Skeletonema* から分解産物が拡散していない、あるいは、分泌している場合でも、*Aplanochytrium* に影響のある濃度に達していないことが示された。

*Aplanochytrium* と *Skeletonema* を 1 つの区画で培養し、もう一方の区画で *Aplanochytrium* を培養した。その結果、*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養では *Aplanochytrium* の細胞数は増加したが、単独で培養した *Aplanochytrium* の細胞数はほとんど増加しなかった (図 3-3 e)。このことから、*Skeletonema* が *Aplanochytrium* と接触した場合でも、*Skeletonema* は分解産物が拡散していない、あるいは、分泌している場合でも、*Aplanochytrium* に影響のある濃度に達していないことが示された。

*Aplanochytrium* と *Skeletonema* を 1 つの区画で培養し、もう一方の区画で *Skeletonema* を培養した。その結果、単独で培養した *Skeletonema* の細胞数は増加したが、*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養では *Skeletonema* の細胞数は増加しなかった (図 3-3 f)。このことから、*Aplanochytrium* が *Skeletonema* と接触した場合でも、*Aplanochytrium* は分解酵素や殺藻物質を細胞外に分泌していない、あるいは、分泌している場合でも、*Skeletonema* に影響のある濃度に達していないことが示された。

以上の結果から、*Aplanochytrium* は *Skeletonema* と同じ区画で培養した場合のみ *Aplanochytrium* は *Skeletonema* から栄養を摂取することができることを示しており、*Aplanochytrium* が *Skeletonema* から栄養を摂取するためには、*Skeletonema* に接触する必要があることが明らかになった。

#### 2.4. *Aplanochytrium* による珪藻からの栄養摂取の観察

*Aplanochytrium* は、d-GPY 液体培地や SeaAct Medium 液体培地のような栄養培地で培養すると、栄養細胞は直径 5~10  $\mu\text{m}$  の球形または卵形になり、長さ 50  $\mu\text{m}$  以上の外質ネット

を伸長した(図 3-4)。*Aplanochytrium* の栄養細胞は細胞分裂を繰り返して孢子囊[sporangia]を形成し、成熟した孢子囊は不動孢子を放出する。不動孢子は栄養細胞へと成長し、外質ネットを伸長するようになる(例えば, Ulken et al. 1985, Moro et al. 2003, Leander et al. 2004)。

光学顕微鏡を使用し、*Aplanochytrium* が *Skeletonema* と *Chaetoceros* から栄養を摂取している様子を観察した。ここでは、*Skeletonema* の観察結果を示す。

*Aplanochytrium* の外質ネットが *Skeletonema* に付着したおよそ 2~5 時間後に、葉緑体が 1~3 分という短時間のうちに収縮し、*Skeletonema* の葉緑体が黄色から白色に変化した(図 3-5, 3-6)。*Aplanochytrium* が *Skeletonema* から栄養を摂取し、ほぼすべての葉緑体の色が黄色から白色に変化するとともに、*Aplanochytrium* の栄養細胞は孢子囊を形成し、不動孢子を放出した(図 3-5, 3-7)。不動孢子の数や大きさは、Moro et al. (2003) による報告と同程度であった。さらに、*Aplanochytrium* は珪藻に付着し、最大で直径 1,000  $\mu\text{m}$  の集合体を形成した(図 3-5, 3-8)。

さらに、走査型電子顕微鏡による観察を行い、*Aplanochytrium* が *Skeletonema* にどのように付着し栄養摂取している様子を観察した。その結果、*Aplanochytrium* の外質ネットが *Skeletonema* の被殻の隙間から細胞内部に侵入している様子が観察された(図 3-9)。

### 3.考察

#### 3.1.珪藻に付着するヤブレッツボカビ類に関する報告

これまでに、野外から採取されたヤブレッツボカビ様生物が珪藻に付着している様子が観察されている。ヤブレッツボカビ様生物が珪藻に付着している様子を初めて観察したのは、Gaertner (1979) である。ノルウェーで採取したヤブレッツボカビ様生物が、*Thalassiosira nordenskioldii*, *Chaetoceros* sp., *Thalassionema nitzschioides* に付着している様子を観察した。珪藻に付着したヤブレッツボカビ類は、二分裂を繰り返すことから *Schizochytrium* 属であると同定されている。また、*Schizochytrium* sp. の成長に伴い、珪藻の細胞質が収縮している様子が観察された。Rughukumar (1986) はヤブレッツボカビ類が瀕死の珪藻 *Coscinodiscus* sp., *Navicula* sp., *Nitzschia* sp., *Grammatophora* sp., *Melosira* sp. に付着している様子を観察し、生活史からこのヤブレッツボカビ様生物が *Ulkenia visurgensis* であると同定した。

本研究では、*Schizochytrium* と *Ulkenia* を含む系統学的に多様な 9 属のヤブレッツボカビ類と生きている珪藻の二員培養を行った。その結果、主に *Aplanochytrium* が珪藻から栄養を摂取する能力が高いことが明らかになった。

一方、珪藻に付着している様子が観察された *Schizochytrium* や *Ulkenia* は珪藻から栄養を摂取する能力は低かった。この理由について以下のように考察した。以前から、ヤブレッツボカビ類は、形態学的特徴によって分類されてきた。Gaertner (1979) と Rughukumar (1986) も、光学顕微鏡で珪藻に付着したヤブレッツボカビ類を観察し、*Schizochytrium*, *U. visurgensis* であると同定している。*Schizochytrium* と *Ulkenia* の細胞は二分裂を行い、鞭毛をもつ遊走細胞を放出する (Goldstein and Belsky 1964, Gaertner 1977, Yokoyama et al. 2007)。一方、*Aplanochytrium* は鞭毛をもたない不動胞子を形成する (Bahnweg and Sparrow 1972)。このように、*Schizochytrium* や *Ulkenia* と *Aplanochytrium* は、細胞形態や生活史の観察によって区別できる。しかしながら、ヤブレッツボカビ類の細胞はいずれの系統群も球形であり、1 つの系統群でも複数の分裂様式をもつ。さらに、培地によって、細胞および遊走細胞の大きさ、細胞壁の厚さ、外質ネットなどの形質が変化するため分類が困難である (Booth and Miller 1968, Doi and Honda 2017)。Gaertner (1979) と Rughukumar (1986) は、光学顕微鏡による観察のみであったため、同定が不十分であった可能性がある。野外から採取したヤブレッツボカビ類を同定するためには、顕微鏡観察だけでなく、分子学的手法を用いることが望ましい。例えば、蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションさせ、特異的かつ高感度に検出する方法である FISH が挙げられる。これまでに、ヤブレッツボカビ類の検出のためのプ

ロトコールが開発され、野外サンプルへの適応が行われている（2003 年度 甲南大学 卒業研究生 笹倉 侑香里氏 卒業研究, 2004 年度 甲南大学大学院 博士後期課程修了 高尾 祥丈氏 博士学位論文, Takao et al. 2007a）。

これまでは、ラビリンチュラ類がどのような海域に多く生息しているかを把握すること、細胞密度とクロロフィル a 濃度や有機物との相関によって、ヤブレツボカビ類が何から栄養を摂取するかが推測されており、培養実験による詳細な観察は行われていなかった。本研究では、培養実験によって、*Aplanochytrium* が生きている珪藻から栄養を摂取できることを明らかにした。

### 3.2. ヤブレツボカビ類と植物プランクトンの関係

これまでに、ヤブレツボカビ類の現存量とクロロフィル量の相関関係に関する報告がある。

1 つ目の報告は、2009 から 2010 年にハワイ沖で行われた調査である（Li et al. 2013）。調査の結果、ヤブレツボカビ類の細胞密度が高い水深とクロロフィル量が高い水深と一致していることが明らかになった。同時に採取したサンプルから DNA を抽出し、ヤブレツボカビ類特異的なプライマー（LABY-A, LABY-Y）で増幅したアンプリコン [amplicon] の配列を決定した。その結果、25 OTUs のうち 20 OTUs が *Aplanochytrium* に一致することが示された。また、河川の影響を受けている瀬戸内海やアラビア海において、アクリフラビン直接計数法でヤブレツボカビ類の細胞密度が推定され、クロロフィル量と正の相関がみられた（Naganuma et al. 1998, Kimura et al. 2001, Raghukumar et al. 2001）。本研究では、*Aplanochytrium* が生きている珪藻から栄養を摂取できることを示しており、*Aplanochytrium* を含むヤブレツボカビ類の細胞密度とクロロフィル量に正の相関があることは妥当な結果として理解できる。

一方で、*Aplanochytrium* とクロロフィル量に負の相関があるという報告もある。ラビリンチュラ類特異的プライマーセット（18S001, 18S13）を使用した定量 PCR によって、中国の珠江デルタに生息するラビリンチュラ類の現存量（18S rDNA コピー数）が推定された（Bai et al. 2018）。さらに、同時に採取したサンプルから DNA を抽出し、ラビリンチュラ類特異的プライマーで増幅したアンプリコンの配列を決定した。その結果、*Labyrinthula* と *Thrautochytrium*, *Parietichytrium* はクロロフィル量とは正の相関がみられたが、*Aplanochytrium*, *Ulkenia*, *Aurantiochytrium*, *Schizochytrium*, 未分類のヤブレツボカビ類は、クロロフィル量との相関はみられなかった。

*Aplanochytrium* は植物プランクトンだけでなく、陸起源有機物を分解する能力をもつ可能性がある。植物プランクトンが多い時期は植物プランクトンから栄養を摂取し、植物プランクトンが少ない時期は陸起源有機物を分解するなど、*Aplanochytrium* の生態学的な役割は明らか

になっていない。今後、培養実験や野外調査などの研究をする必要がある。

### 3.3.動物プランクトンによる *Aplanochytrium* の捕食

*Aplanochytrium* は、インド洋や北太平洋から採取したカイアシ類 [copepod] の消化管や糞便ペレットから検出されている (Damare and Raghukumar 2006, 2010, Hirai et al. 2018)。なかでも、Hirai et al. (2018) は、次世代シーケンサー解析によって *Calanus sinicus* の消化管内容物から *Aplanochytrium* を検出している。*C. sinicus* は亜熱帯西部北太平洋の沿岸水域に広く生息する大型カイアシ類であり、動物プランクトンの大部分を占める (Hulsemann 1994, Nakata and Hidaka 2003)。*C. sinicus* の卵やノープリウス幼生は、マイワシ [*Sardinops melanostictus*] やウルメイワシ [*Etrumeus teres*] の産卵期の主要な餌となる (Hirai et al. 2017)。Hirai et al. (2018) の調査から、*Aplanochytrium* が *C. sinicus* の主要な餌である可能性があることが示された。さらに、全生物に対する *Aplanochytrium* のリード数の割合が環境サンプルよりも消化管内容物の方が高いことから、*C. sinicus* が *Aplanochytrium* を積極的に餌として選択的に摂食していることが示唆された。

*C. sinicus* は直径が 20~50  $\mu\text{m}$  の粒子を捕食し、10  $\mu\text{m}$  以下の粒子は捕食することができない (Yang et al. 2009)。にも関わらず、栄養細胞の直径が 5~10  $\mu\text{m}$  の *Aplanochytrium* を摂食している。本研究では、*Aplanochytrium* と珪藻が、最大で 1,000  $\mu\text{m}$  の集合体を形成する様子を観察した。環境中でも、ヤブレッツボカビ類は集合体を形成することが確認されている (Li et al. 2013, Bochdansky et al. 2016)。*C. sinicus* および動物プランクトンはこのような集合体を摂食している可能性がある。

### 3.4.*Aplanochytrium* と寄生性ツボカビとの比較

ツボカビ [chytrid] は、動物プランクトン (Johnson et al. 2006)、植物プランクトン (Ibelings et al. 2004, Kagami et al. 2014)、両生類 (Berger et al. 1998, Daszak et al. 1999, Longcore et al. 1999) など多様な生物に寄生することが知られている生物群である。オピストコント生物群 [opisthokonta] に位置する真菌類に属しており、そのなかでも祖先的な生物群である (James et al. 2006)。ヤブレッツボカビ類やサカゲツボカビ類 [hyphochytrids] にも同じく“ツボカビ”の名がついているが、以上の生物群はストラメノパイル生物群に属しており、系統学的に異なるグループである。

*Zygorhizidium affluens* や *Rhizophidium planktonicum* は、珪藻である *Asterionella formosa* に寄生することで栄養を摂取する (Kagami et al. 2007)。ここでは、珪藻に“寄生”することで栄養を摂取するツボカビと *Aplanochytrium* について、比較を行った。

ツボカビとヤブレツボカビ類は、細胞が球状であること、基質に付着するための構造をもつなど、形態学的に類似している点が多い。一方で、異なる点も数多くある。

1つ目の異なる点は、栄養摂取様式である。ツボカビは鞭毛をもつ遊走子 [zoospore] を形成し、寄主細胞である大型珪藻の表面に着生する。着生後、仮根 [rhizoid] を大型珪藻の細胞内部に侵入させて栄養を摂取し、胞子体を形成する。胞子体が成熟すると、胞子体内で形成された遊走子が放出される (Sime-Ngando 2012)。一方の *Aplanochytrium* は、栄養細胞は細胞の周辺に放射状の外質ネットを展開し、栄養摂取の対象である植物プランクトンが付着するのを待つ。付着後、外質ネットを植物プランクトンの細胞内部に侵入させて栄養を摂取し、胞子嚢を形成する。胞子嚢が成熟すると、胞子嚢内で形成された不動胞子が放出される。このように、*Aplanochytrium* は外質ネットを放射状に展開することで、細胞周辺のより広い範囲の植物プランクトンから栄養を摂取することができる。

2つ目の異なる点は、栄養摂取過程における被食者 (珪藻) と捕食者 (ツボカビもしくは *Aplanochytrium*) の大きさの変化である。大型の珪藻 (>50  $\mu\text{m}$ ) は動物プランクトンが摂食するには大きすぎるため (Sterner 1989)、植物食性の魚類が少ない水域では、食物網には組み込まれずに沈降すると考えられてきた (Legendre and Le Fèvre 1991)。しかし、ツボカビが大型の珪藻に寄生、栄養を摂取すると、ツボカビは遊走子を放出する。さらに、ツボカビによって寄生された大型の珪藻は分解され、断片化する。遊走子や断片化した大型の珪藻が動物プランクトンに摂食されるため、大型の珪藻は沈降するのではなくツボカビを介して食物網に組み込まれる。このようなツボカビを介した物質経路は、マイコループ [Mycoloop] と呼ばれている (Kagami et al. 2014)。ツボカビは、動物プランクトンが摂食できないサイズの大型珪藻を「小型化」し、摂食できるようにする。一方の *Aplanochytrium* は、外質ネットに付着した珪藻と集合体を形成することで「大型化」し、動物プランクトンが摂食できるようになる。

3つ目の異なる点は、宿主-寄生者の関係である。一部のツボカビでは複数属の珪藻に寄生することが報告されているが、多くのツボカビの宿主特異性は高く、特定の植物プランクトンにのみ寄生する (Gromov et al. 1999, Kagami et al. 2007)。一方の *Aplanochytrium* は珪藻の *Skeletonema*, *Chaetoceros* から栄養を摂取する様子が確認した。また、珪藻だけでなく、プラシノ藻である *Pyramimonas parkeae* やハプト藻である *Pleurochrysis roscoffensis* から栄養摂取しており (2018年度 甲南大学 卒業研究生 茂木 大地氏 私信)、“宿主”の特異性はみられない。

一方で、動物プランクトンに供給される栄養素には共通点がある。ツボカビの遊走子は、寄主

細胞である大型珪藻から栄養を摂取し、高度不飽和脂肪酸やコレステロール [cholesterol] を豊富に合成・蓄積する (Kagami et al. 2007a)。ツボカビの遊走子は動物プランクトンによって捕食されるため、ツボカビが蓄積している高度不飽和脂肪酸やコレステロールは、動物プランクトンに供給されると考えられている (Kagami et al. 2007a)。ラビリンチュラ類も、高度不飽和脂肪酸、特に DHA を生成する (Nakahara et al. 1996, Lewis et al. 1999, Fan et al. 2000, Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Kaya et al. 2011, Nakazawa et al. 2014)。 *Aplanochytrium* は動物プランクトンや魚類に捕食されていると推測される (Raghukumar and Raghukumar 1999, Damare and Raghukumar 2006, 2010, Hirai et al. 2018)。以上のことから、 *Aplanochytrium* が生成した DHA が動物プランクトンに供給されていると考えられる。

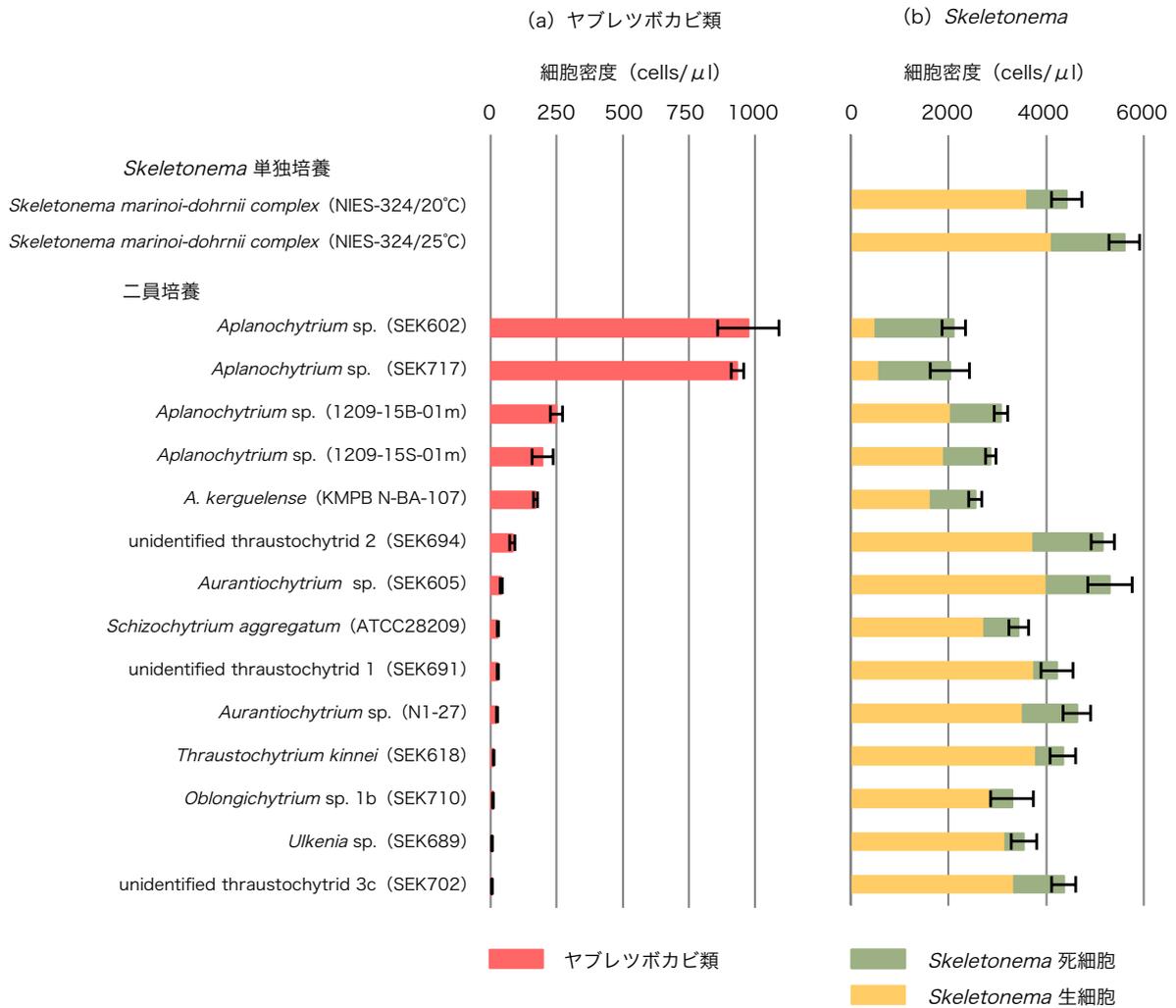


図3-1.系統群ごとの*Skeletonema*からの栄養摂取能の比較

ヤブレッツボカビ類が珪藻から栄養を摂取するか検討するため、ヤブレッツボカビ類9属14株と*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) の二員培養を行い、二員培養10日目に、ヤブレッツボカビ類と*Skeletonema*の細胞数の細胞数を計数した。

- (a) ヤブレッツボカビ類の細胞数
- (b) *Skeletonema*の細胞数

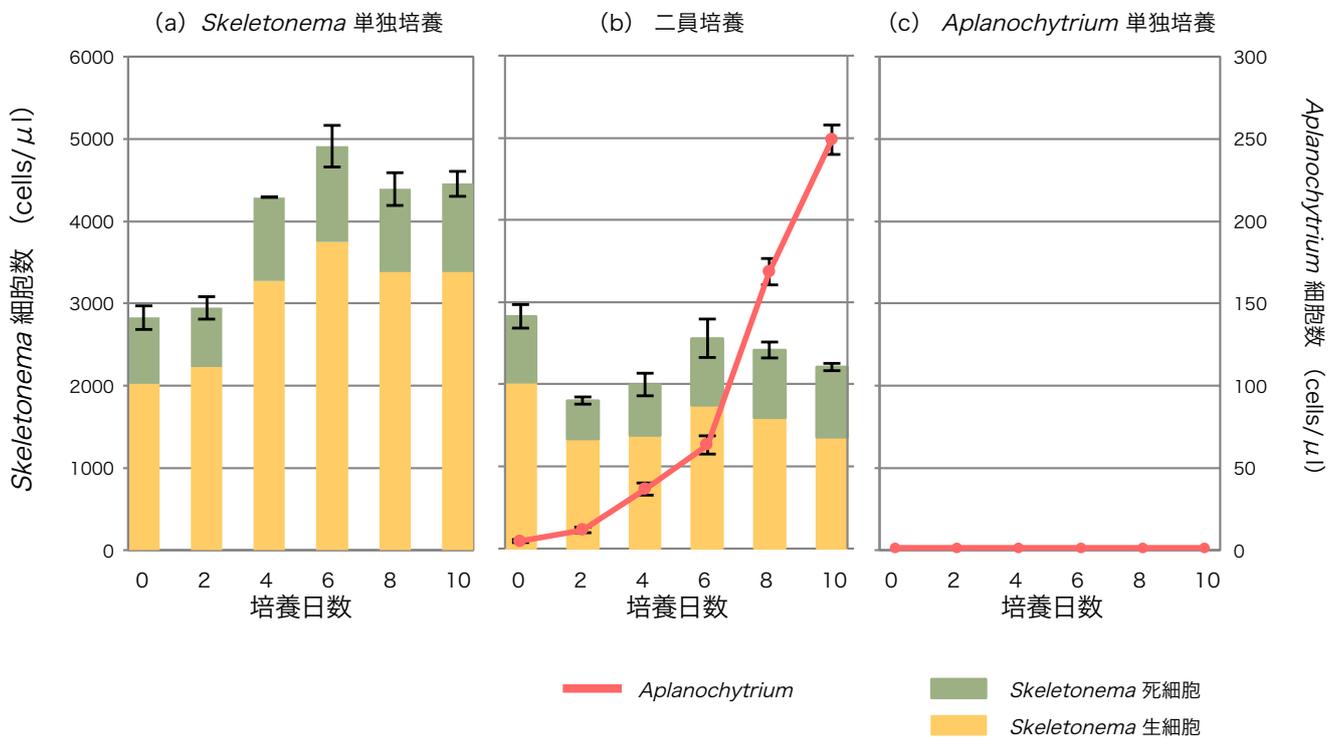


図3-2. *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養と単独培養の経時的な観察

*Aplanochytrium* がどのような状態の *Skeletonema* から栄養を摂取しているかを明らかにするために、*Aplanochytrium* (KMPB N-BA-107) と *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) の二員培養を行った。二員培養と *Skeletonema* 単独培養、*Aplanochytrium* 単独培養について、*Aplanochytrium* と *Skeletonema* の細胞数を経時的に計数した。

- (a) *Skeletonema* 単独培養
- (b) *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養
- (c) *Aplanochytrium* 単独培養

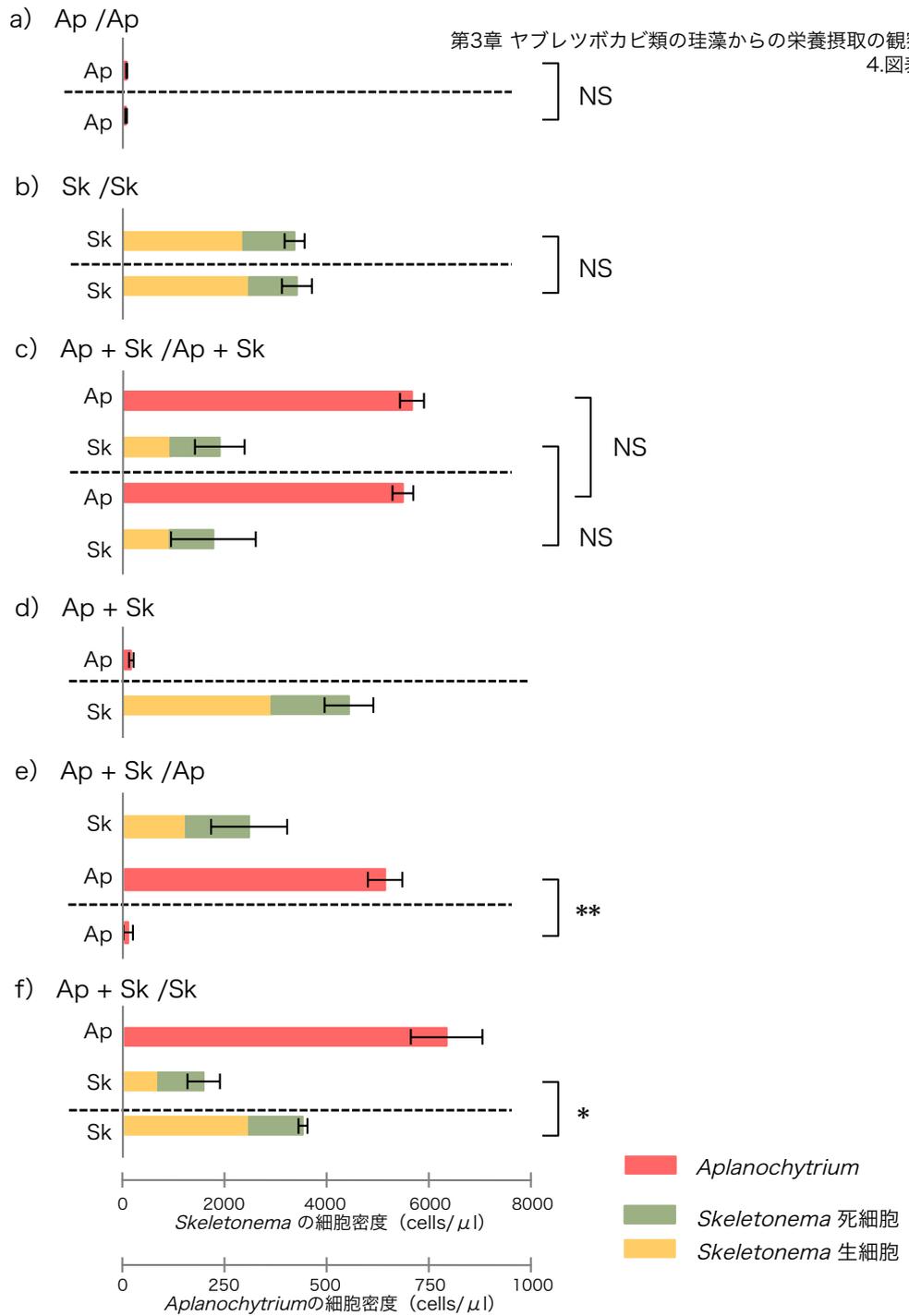


図3-3.別府フラスコによる分解酵素と分解産物の影響の検討

*Aplanochytrium* が *Skeletonema* と接触することで分解酵素や殺菌物質を細胞外に分泌する可能性を検証するために、別府フラスコを使用し、分解酵素が細胞外に分泌されているかを検討した。  
*Aplanochytrium* (KMPB N-BA-107; 図中, Ap) と *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324; 図中, Sk) の二員培養を行い、培養10日目に、*Aplanochytrium* および *Skeletonema* の細胞数を計数した。

p < 0.05 \*, p < 0.01 \*\*, p > 0.05 NS

- (a) 両方の区画で *Aplanochytrium* を培養した場合
- (b) 両方の区画で *Skeletonema* を培養した場合
- (c) 両方の区画で *Aplanochytrium* と *Skeletonema* を培養した場合
- (d) 一方の区画で *Aplanochytrium* , もう一方の区画で *Skeletonema* を培養した場合
- (e) 一方の区画で *Aplanochytrium* と *Skeletonema* , もう一方の区画で *Aplanochytrium* を培養した場合
- (f) 一方の区画で *Aplanochytrium* と *Skeletonema* , もう一方の区画で *Skeletonema* を培養した場合

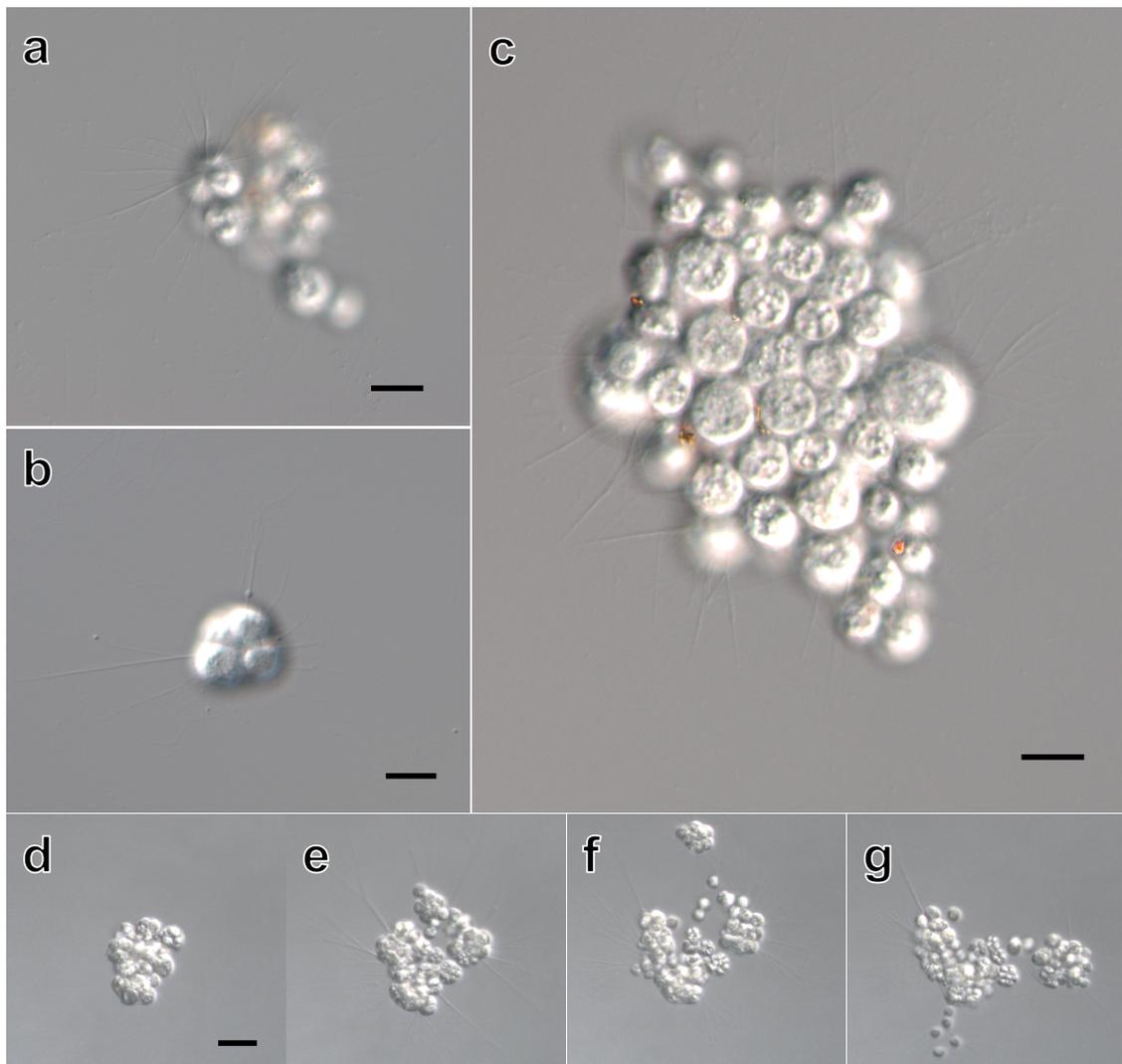


図3-4.栄養培地で培養した*Aplanochytrium* の光学顕微鏡観察

*Aplanochytrium* は、栄養培地で培養すると、栄養細胞は直径5~10 $\mu\text{m}$ の球形または卵形になり、長さ50 $\mu\text{m}$ 以上の外質ネットを伸長した。栄養細胞は細胞分裂を繰り返して孢子囊を形成し、成熟した孢子囊は不動孢子を放出する。不動孢子は栄養細胞へと成長し、外質ネットを伸長するようになる。

(a) *Aplanochytrium* sp. (SEK 717)

(b) *Aplanochytrium* sp. (SEK 602)

(c) *Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107)

(d-g) *Aplanochytrium kerguelense* の外質ネットを使用して運動する [0, 716, 827, 865分後] 。

スケールバーはすべて10 $\mu\text{m}$

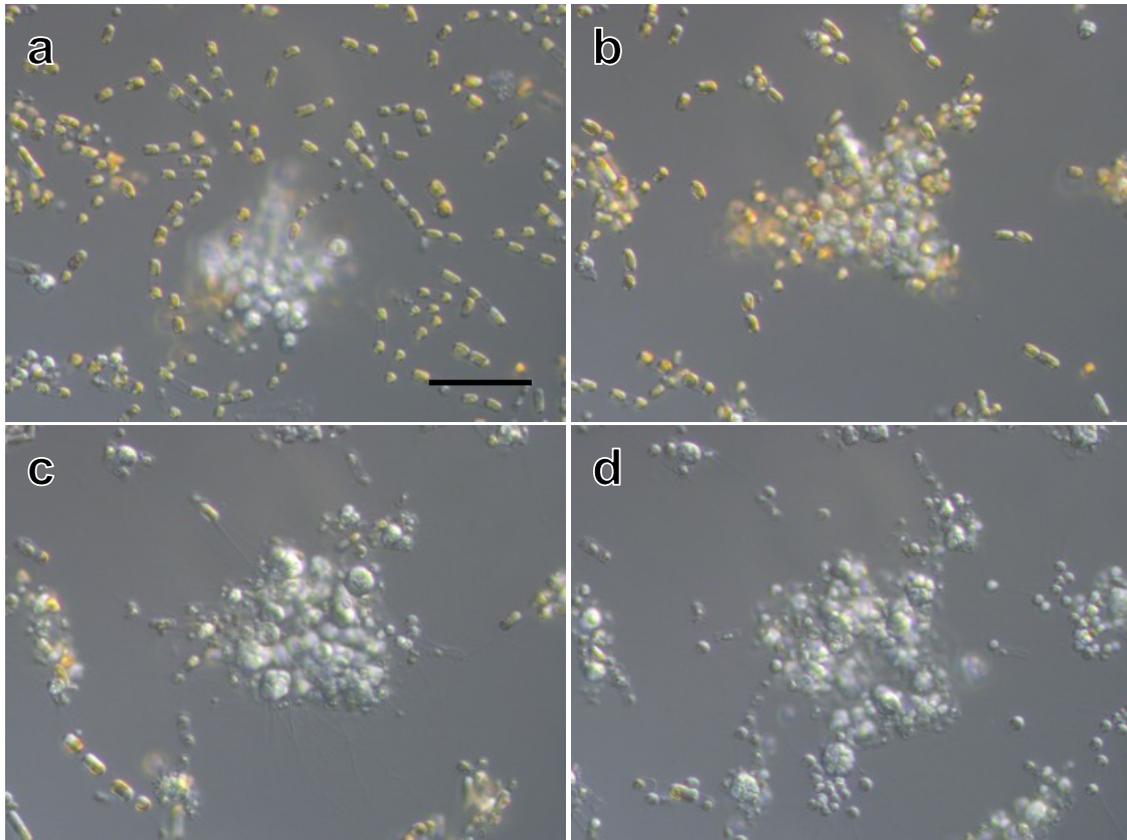


図3-5. *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養の光学顕微鏡観察

- (a) 生きている（褐色） *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) と *Aplanochytrium* sp. (SEK 717)。
- (b) *Aplanochytrium* の外質ネットによって、 *Skeletonema* が引き寄せられる [174分後]。
- (c) *Aplanochytrium* と死んでいる（白色） *Skeletonema* が集合体を形成する [603分後]。  
この段階では、 *Aplanochytrium* のコロニーから放射状に外質ネットが伸長している。
- (d) *Aplanochytrium* による *Skeletonema* からの栄養摂取が終わり、 不動胞子が放出された [843分後]。

スケールバーは50 $\mu$ m

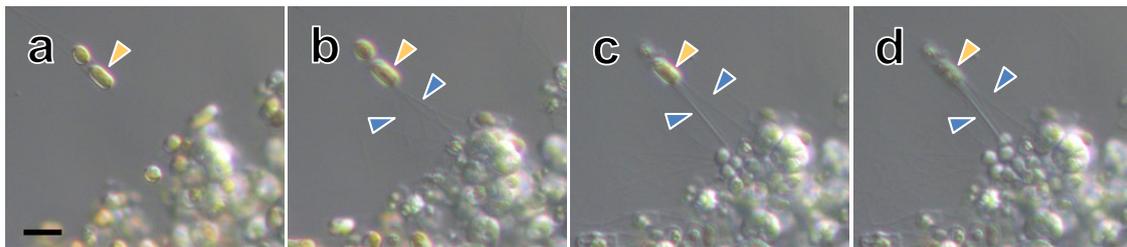


図3-6.外質ネットによる *Skeletonema* からの栄養摂取

- (a) 生きている（褐色） *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) と *Aplanochytrium* sp. (SEK 717)。
- (b) *Aplanochytrium* の外質ネット〈青矢じり〉の先端が *Skeletonema* 〈黄矢じり〉に付着する [0分後]。
- (c) *Aplanochytrium* の外質ネットが太くなる [186分後]。
- (d) *Skeletonema* の葉緑体が急激に縮小し、黄色から白色に変色する [189分後]。

スケールバーは10 $\mu$ m

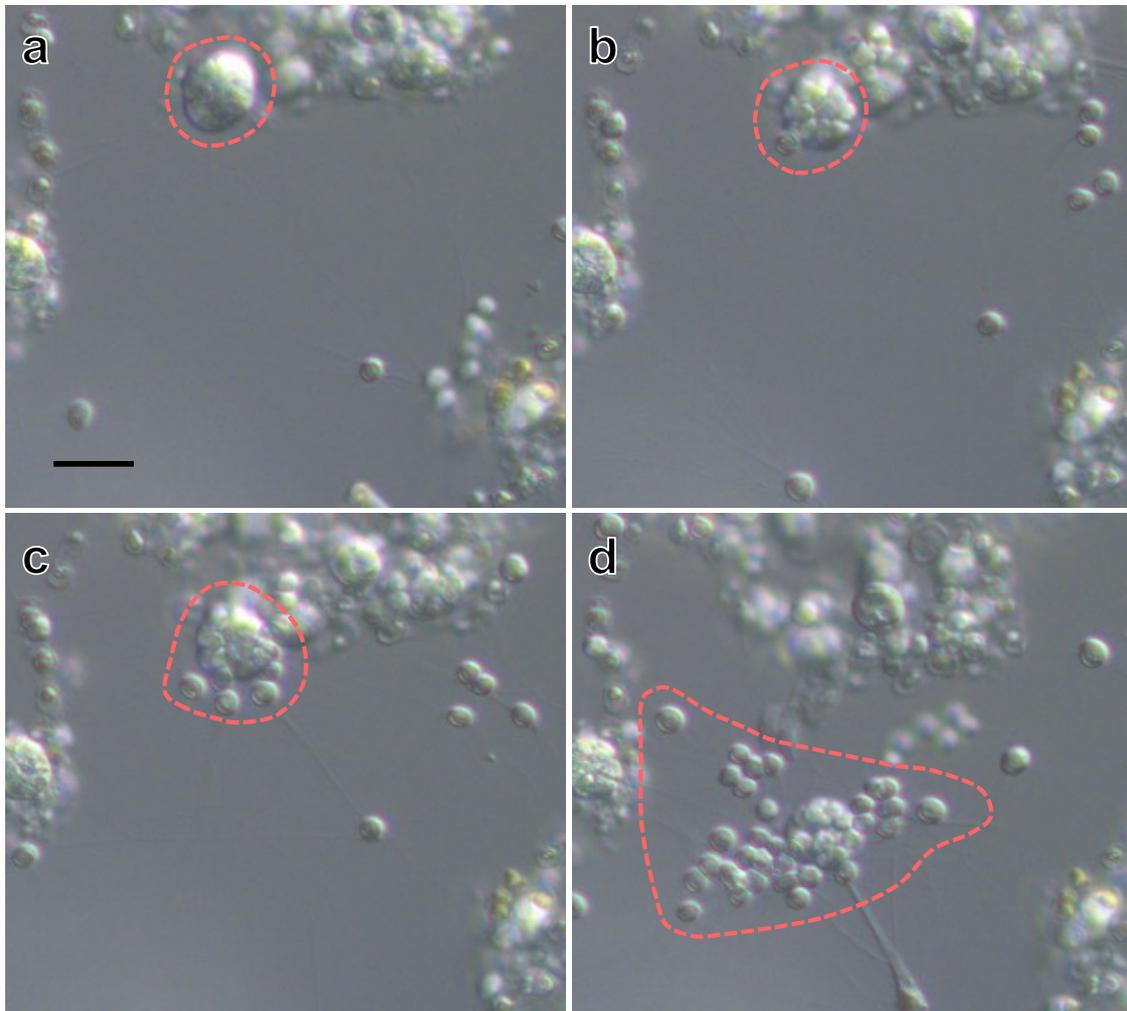


図3-7.不動孢子形成過程の観察

- (a) *Aplanochytrium* sp. (SEK 717) の未成熟な孢子囊。
- (b) 細胞質分裂を行い、孢子囊が成熟する [28分後] 。
- (c) 不動孢子の放出が開始する [31分後] 。
- (d) およそ30個の不動孢子が放出される [39分後] 。

スケールバーは10 $\mu$ m

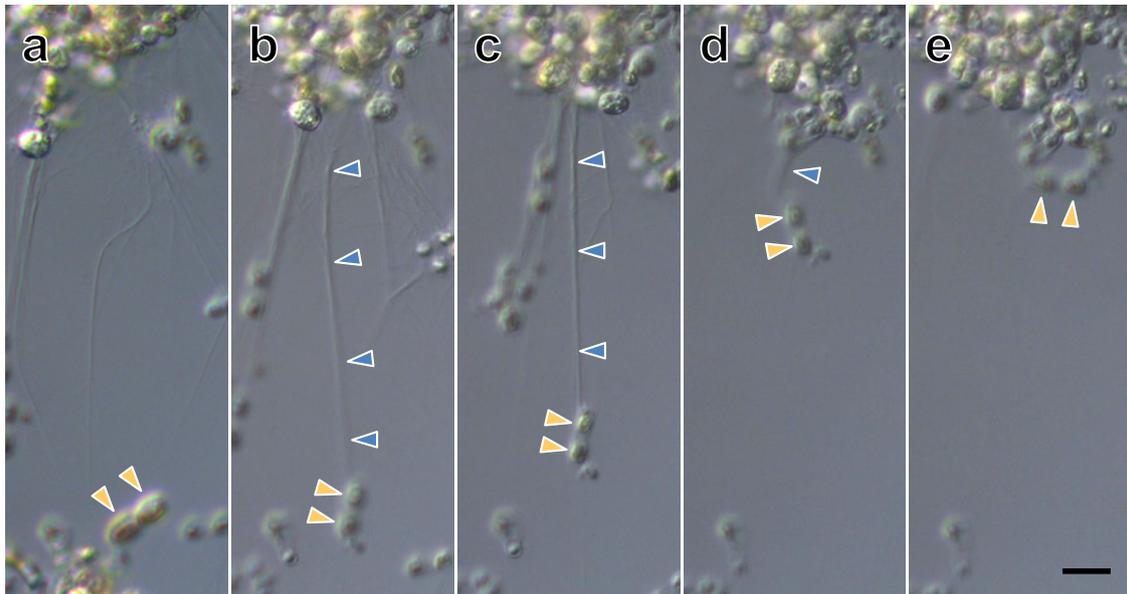


図3-8.外質ネットによる *Skeletonema* との集合体形成

- (a) 生きている（褐色） *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) と *Aplanochytrium* sp. (SEK 717)。
  - (b) *Aplanochytrium* の外質ネット〈青矢じり〉の先端が *Skeletonema*〈黄矢じり〉に付着する。
  - (c) *Skeletonema*は、*Aplanochytrium* の外質ネットによって、*Aplanochytrium*のコロニーに向かって引き寄せられる [45分後]。
  - (d-e) *Skeletonema* は、*Aplanochytrium*と集合体を形成した [165分後, 215分後]。
- スケールバーは10 $\mu$ m

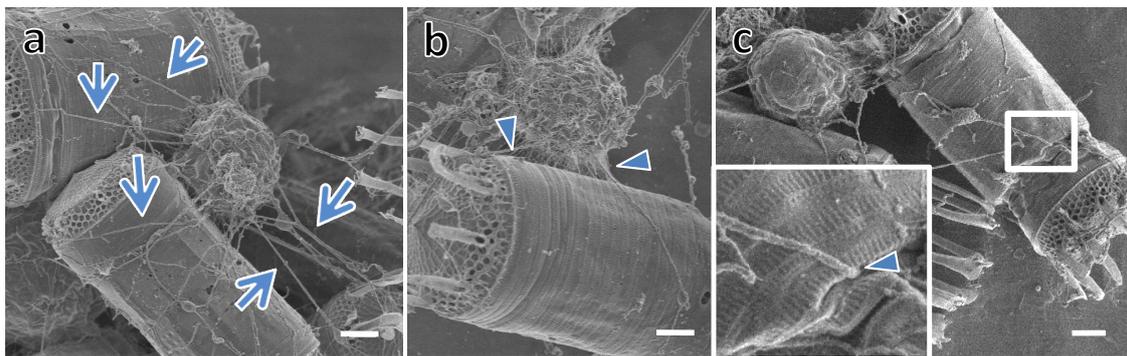


図3-9. *Aplanochytrium* と *Skeletonema* の二員培養の走査型電子顕微鏡観察

- (a-b) *Aplanochytrium* sp. (SEK 717) が太い外質ネット〈青矢印〉および細い外質ネット〈青矢じり〉によって、*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES 324) に付着している。
- (c) 太い外質ネット〈青矢印〉が *Skeletonema* に侵入している。

スケールバーは1  $\mu$ m

表3-1.二員培養に使用したヤブレツボカビ類と珪藻

株番号	株番号	株番号	属	培養温度 (°C)	サンプリング地点	引用文献
SEK number	NBRC number	Original number				
ヤブレツボカビ類						
		KMPB N-BA-107	<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	25	インド南部	Honda et al. (1999)
SEK602		376-05m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	20	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
SEK717		1110-8S-01m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市 六甲アイランド	Ueda et al. (2015)
SEK754		1209-15B-01m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
SEK758		1209-15S-01m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
SEK 605	NBRC 110806	08-047-01yD1	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	25	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
		N1-27	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	25	日本 茨城県	Huang et al. (2003)
SEK 710	NBRC 110837	1110-15S-01m	<i>Oblongichytrium</i> sp.1b	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
		ATCC28209	<i>Shizochytrium aggregatum</i>	25	インド西部	Honda et al. (1999)
SEK 618	NBRC 110826	261-01m	<i>Thraustochytrium aff. kinnei</i>	20	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
SEK 689	NBRC 110832	1106-8S-01m	<i>Ulkenia</i> sp.	20	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
SEK 691	NBRC 110846	155-02m	unidentified thraustochytrid 1	20	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
SEK 694	NBRC 110848	310-08m	unidentified thraustochytrid 2a	25	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
SEK 702	NBRC 110856	1107-15S-04m	unidentified thraustochytrid 3c	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
珪藻						
		NIES-324	<i>Skeletonema marinoi-dohrnii</i> complex	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	
		NIES-3712	<i>Chaetoceros setoensis Ikari</i>	25	日本 広島県 広島市 広島湾	

KMPB: Kulturensammlung Mariner Pilze Bremerhaven, Alfred-Wegner-Institut für Polar und Meeresforschung

SEK: Laboratory of Systematics and Evolution at Konan University

ATCC: American Type Culture Collection

NIES: National Institute Environmental Studies

表3-2.ヤブレッツボカビ類を培養する栄養培地の組成

(A) d-GPY

	濃度 (%)
D- (+) -グルコース [D- (+) -Glucose]	0.2
ポリペプトン [Polypepton]	0.1
乾燥酵母エキス [Extract Yeast Dried]	0.05
寒天末 [Agar, powder]	1.5
自然海水 (兵庫県 淡路島 北淡町)	50
イオン交換水 [distilled water]	50

121°C 20分間 オートクレーブ滅菌処理

(B) SeaAct Medium

	濃度 (%)
D- (+) -グルコース [D- (+) -Glucose]	0.2
SeaAct Medium	10
MARINE ART SF-1 (大阪薬研株式会社)	1.7
イオン交換水 [distilled water]	100

121°C 20分間 オートクレーブ滅菌処理

表3-3.f/2培地の組成

硝酸ナトリウム [Sodium Nitrite ; NaNO <sub>3</sub> ]	7.5mg
リン酸二水素ナトリウム [Sodium Dihydrogen Phosphate ; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0.6mg
シアノコバラミン [Cyanocobalamin ; Vitamin B <sub>12</sub> ]	0.05 μg
ビオチン [Biotin ; Vitamin B <sub>7</sub> ]	0.05 μg
塩酸チアミン水和物 [Aneurine Hydrochloride Hydrate ; Vitamin B <sub>1</sub> ]	10 μg
メタけい酸ナトリウム九水和物 [Sodium Metasilicate Nonahydrate ; Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O]	1mg
f/2 metals <sup>1)</sup>	0.1ml
自然海水 (兵庫県 淡路島 北淡町)	99.9ml

121°C 20分間 オートクレーブ滅菌処理

f/2 metals

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 [Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt,2-hydrate ; Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O]	440mg
塩化鉄 (III) 六水和物 [Iron (III) chloride,6-hydrate ; FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O]	316mg
硫酸コバルト (II) 七水和物 [Cobalt (II) Sulfate, 7-hydrate ; CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O]	1.2mg
硫酸亜鉛七水和物 [Zinc Sulfate, 7-hydrate ; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O]	2.1mg
塩化マンガン四水和物 [Manganese (II) Chloride 4-hydrate ; MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O]	18mg
硫酸銅 (II) 五水和物 [Copper (II) Sulfate, 5-hydrate ; CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O]	0.7mg
モリブデン (VI) 酸ナトリウム二水和物 [Disodium Molybdate (VI) , 2-hydrate ; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O]	0.7mg
イオン交換水 [distilled water]	100ml



## 第4章

### 定量PCRによる*Aplanochytrium*の現存量調査

## 1.材料と方法

### 1.1.野外サンプリング

#### 1.1.1.調査場所と調査期間

大阪湾でのサンプリングは、2016年3月から2018年1月のおよそ2年間、大阪府立環境農林水産総合研究所の調査船「おおさか」に乗船させていただき調査を行った。2018年2月からは、同研究所からサンプルを送付いただいた。

北緯 34° 29.95′, 東経 135° 10.73′ に位置する Station 8 (以下, 湾央) と北緯 34° 36.00′, 東経 135° 17.75′ に位置する Station 15 (以下, 湾奥) で行った (図 4-1)。定点番号は同研究所が行っている浅海定点調査の定点番号に準じる。湾央 は淀川河口からおよそ 30 km 離れており, 河川水の影響をほとんど受けない海域である。湾奥 は, 淀川河口からおよそ 15 km 離れており, 降雨による河川水の出水の影響を受けやすい海域である。

これまでに, 大阪湾におけるヤブレッツボカビ類の継続的な調査が行われている (Ueda et al. 2015)。この調査では, マツ花粉 MPN 法によって細胞密度が推定され, 湾央の表層から平均 122.1 cells/L, 湾央の底層から平均 46.9 cells/L, 湾奥の表層から平均 508.9 cells/L, 湾奥の底層から平均 45.0 cells/L のヤブレッツボカビ類が検出された。

#### 1.1.2.野外サンプルの準備

採取した海水 500 ml をメンブレンフィルター (孔径 0.8  $\mu\text{m}$ ; Merck Millipore) でろ過し, 4 分割した。分割した一片を 1.5 ml マイクロチューブに回収し, サブサンプルとした。サブサンプルは, DNA 抽出まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。

## 1.2.定量 PCR による細胞密度の推定に向けた取り組み

これまでに, 渦鞭毛藻類である *Ostreopsis* 属をモデル生物として使用し, サンプルの DNA 回収率を考慮した定量 PCR が新しく開発された (Hariganeya et al. 2013, 図 4-2)。

まず, サブサンプルから DNA 抽出を行う。DNA を抽出する前に, 一定量のプラスミド DNA (内部標準) をサブサンプル # 1 に添加し, その後, DNA 抽出を行う (a)。また, サブサン

ル#2には、DNA抽出後に一定量のプラスミドDNAを添加する(b)。次に、内部標準として添加したプラスミドDNAに特異的なプライマーを使用して定量PCRを行うことで、プラスミドDNAの定量を行う。DNA抽出後に添加したプラスミドDNAの量をDNA抽出後に添加したプラスミドDNAの量で除することで、DNA回収率を算出する(a/b)。さらに、サブサンプル#1の目的とする生物の「暫定的な」コピー数(x)を定量し、DNA回収率で除することで、「補正された」コピー数を算出する(xb/a)。最後に、目的とする生物の1細胞あたりのコピー数(y)で割ることで、サブサンプルに含まれる細胞数を算出することができる(xb/ya)。

本研究では、この方法による *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度の推定を目指した。

### 1.2.1.プライマーとプローブの設計と特異性の確認

*Aplanochytrium* 系統群の18S rRNA遺伝子の特定の領域に基づいてPCRプライマーセットを設計した。米国生物工学情報センター[National Center for Biotechnology Information: NCBI]が提供している塩基配列データベースであるGenBankに登録されている9配列、培養株からDNAを抽出して配列決定した2配列、合計11配列を、Clustal X 2.0を使用してアライメントをとり、保存されている配列を選択してPCRプライマーセットを設計した(Larkin et al 2007; <http://www.clustal.org/clustal2/>; 図4-3, 表4-1)。

さらに、特異性を高めるために *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを設計した(図4-4, 表4-1)。設計した TaqMan プローブは、Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems) を使用し、Tm 値や GC% などの条件を満たすかを確認した。

*Aplanochytrium* 属特異的プライマーの特異性を確認するために、*Aplanochytrium* 培養株5株 [*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107), *Aplanochytrium* sp. (SEK602), *Aplanochytrium* sp. (SEK717), *Aplanochytrium* sp. (SEK755), *Aplanochytrium* sp. (SEK756)]、他属のヤブレッツボカビ類の培養株9株 [*Aurantiochytrium limacinum* (SR-21), *Parietichytrium sarkarianum* (SEK351), *Botryochytrium radiatum* (SEK597), *Ulkenia amoiboidea* (SEK615), *Thrausochytrium aureum* (ATCC34304), *Schizochytrium aggregatum* (SEK576), *Sicyoidochytrium* sp. (NBRC 102979), *Oblongichytrium* sp. (SEK347), *Thraustochytrium striatum* (SEK533)]、外群 [*Heterosigma akashiwo* (SEK293), *Ochromonas danica* (SEK368)] 2株を対象として、PCRを行った。

ヤブレッツボカビ類と外群のDNAはCTAB法[Cetyl trimethyl ammonium bromide]を用いて抽出した(Ueda et al. 2015)。d-GPY培地で一週間の前培養を行った株を遠心分離によ

って、1.5 ml マイクロチューブに回収した。ペレットを TE バッファー 567  $\mu$ l に溶解した後、10%ドデシル硫酸ナトリウム [sodium dodecyl sulfate : SDS] 30  $\mu$ l と 20 mg ml/l プロテナーゼ K [proteinase K] 3  $\mu$ l を加え、37°C、1時間のインキュベートを行った。次に、5M NaCl 100  $\mu$ l と CTAB-NaCl [10% (w/v) CTAB, 14% (v/v) 5M NaCl, milli-Q 水溶解] 80  $\mu$ l を加え、65°C、10 分間のインキュベートを行った。その後、サンプルと等量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1, v/v) による DNA の精製を 2 回行い、サンプルの 1/10 量の 0.3M 酢酸ナトリウムと等量の 100%イソプロパノールで DNA の沈殿作業を行った。DNA ペレットを 70% エタノール (-20°C) で 2 回洗浄し、最後に、TE バッファー50  $\mu$ l に溶解した。抽出した DNA は-20°Cで保管した。ポリメラーゼ連鎖反応 [Polymerase chain reaction : 以下, PCR] とアガロースゲル電気泳動によって、標的とする生物群である *Aplanochytrium* の DNA のみが増幅しているか確認することで、プライマーの特異性を評価した。まず、設計したプライマーセットを使用して、PCR を行った。PCR 酵素として TAKARA Ex Taq (TAKARA) を使用した。0.5  $\mu$ l の DNA 鋳型、0.25  $\mu$ l の *Aplanochytrium* 属特異的プライマーセット (20 pmol/ $\mu$ l) , 0.125  $\mu$ l の TAKARA Ex Taq (5 U/ $\mu$ l) , 2.5  $\mu$ l の 10  $\times$  Ex Taq Buffer (20 mM Mg<sup>2+</sup> plus) , 2  $\mu$ l の dNTP Mixture (各 2.5 mM) の組成で反応液を調整した。PCR は、94°Cで 30 秒間を 1 サイクル、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、72°Cで 30 秒の 3 ステップを 30 サイクル、72°Cで 7 分を 1 サイクルの条件で行った。PCR 装置は、Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) を使用した。次に、アガロースゲル電気泳動によってアンプリコンを確認した。SYBR™ Safe DNA Gel Stain in 0.5X TBE (Invitrogen) と Agarose L03 「TAKARA」 (TAKARA) を含む 2%アガロースゲルを作製した。アガロースゲル電気泳動によって、標的とする生物群である *Aplanochytrium* の DNA のみが増幅しているかを確認した。

### 1.2.2.プラスミド DNA の調整

本研究では、pGEM-3Z Vector (Promega) を内部標準として使用した。内部標準として添加するプラスミドは、環状プラスミド DNA ではなく線状プラスミド DNA が適していると報告されていることから、pGEM-3Z Vector を制限酵素 *Eco*RI (TAKARA) および *Pst*I (TAKARA) で処理した (Hariganeya et al. 2013) 。Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、 $1 \times 10^7$  (10,000,000) コピーになるように、RNase-free Water (TAKARA) で溶解した。

また、定量 PCR で使用する検量線を作製するため、*Aplanochytrium* の 18S rDNA 領域を

組み込んだプラスミド DNA を調整した。内部標準として使用するプラスミド DNA と同様に、線状化した。*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107) から抽出した DNA を、SR01 (Nakayama et al. 1996) と SR12L1 (Ueda et al. 2015) を使用した PCR によって、18S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅した。まず、*A. kerguelense* の DNA は CTAB 法を用いて抽出し、PCR には、TAKARA Ex Taq を PCR 酵素として使用した。(Ueda et al. 2015; 「1.2.1.プライマーとプローブの設計と特異性の確認」参照)。PCR は、94°Cで 30 秒間を 1 サイクル、94°Cで 30 秒、60°Cで 30 秒、72°Cで 2 分の 3 ステップを 35 サイクル、72°Cで 7 分を 1 サイクルの条件で行った。PCR 装置は、Veriti Thermal Cycler を使用した。次に、アンプリコンを QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製し、精製したアンプリコンを Mighty TA-cloning Kit (TAKARA) で T Vector- pMD20 (TAKARA) にライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液を Competent high JM109 (TOYOBO) に形質転換を行った。Competent high JM109 をアンピシリンナトリウム塩 (SIGMA-ALDRICH) , X-Gal (TAKARA) , IPTG (TAKARA) を含む LB 寒天培地 (表 4-2) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。青/白判定 [Blue-White selection] で白色コロニーを選択し、アンピシリンナトリウム塩を含む LB 液体培地 (表 4-2) で 37°C で一晩振盪培養した。形質転換された Competent high JM109 を 2.0 ml マイクロチューブに回収し、遠心分離にかけてペレットを回収した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を使用してプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA を制限酵素 *Hind* III (TAKARA) および *Xba* I (TAKARA) で処理した。最後に、Qubit 3.0 Fluorometer を用いて測定し、 $1 \times 10^7$  (10,000,000) コピーになるように、RNase-free Water で溶解した。

### 1.2.3.定量 PCR に適した DNA 抽出法

定量 PCR に適した DNA 抽出法を決定することを目的とした。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出法 [phenol-chloroform-isoamyl alcohol : PCI] , CTAB 法 [Cetyl trimethyl ammonium bromide] , ISOPLANT II (NIPPON GENE) および DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN) の 4 種類の方法で野外サンプルから DNA を抽出し、定量 PCR で定量された *Aplanochytrium* のコピー数の比較を行った。

フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出法は、Nakai et al. 2013 に記載されている方法を改変した。サンプルを、5 mg/ml のリゾチームを含む lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 750 mM スクロース) を添加し、37°Cで 30 分間インキュベートした。溶液に 1%ドデシル硫酸ナトリウムおよび 0.5 mg/ml のプロテナーゼ K [proteinase K] を添

加し、55°Cで20分間、さらに72°Cで5分間インキュベートした。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1, v/v/v)およびクロロホルム・イソアミルアルコール(24:1, v/v)で抽出し、3 M 酢酸ナトリウム中のイソプロパノールで沈殿させた。DNA 抽出ペレットを70%エタノールで洗浄した。

CTAB 法は、Ueda et al. (2015) に記載されている方法で行った（「1.2.1.プライマーとプローブの設計と特異性の確認」参照）。

ISOPLANT II と DNeasy PowerSoil Kit は、製品に添付されている使用法の指示に従って使用した。

以上の4種類の方法で抽出されたDNAは、100  $\mu$ l の RNase-free Water で溶解した。

### 1.3. *Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNA コピー数の定量

定量PCRで定量された *Aplanochytrium* の18S rDNA コピー数を細胞数に変換するため、DNA回収率を考慮した定量PCRによって、*Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNA コピー数の定量を行った(Hariganeya et al. 2013, 図4-2)。系統学的に多様な *Aplanochytrium* の18S rDNA コピー数を把握するため、9株の *Aplanochytrium* を対象とした(表4-3)。まず、*Aplanochytrium* の細胞を準備し、サブサンプル#1とサブサンプル#2を用意した。*Aplanochytrium* の細胞はコロニーを形成しやすいことから、1細胞を単離することは困難であると判断した。そこで、100細胞からDNAを抽出し、コピー数を定量することとした。*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107) は d-GPY 液体培地で、*Aplanochytrium* sp. (SEK602, SEK603, SEK 717, SEK 753, SEK 754, SEK 755, SEK 756, SEK 757) は SeaAct Medium 液体培地で1週間の前培養を行った。Fuchs-Rosenthal 血球計数板を用いて *Aplanochytrium* の細胞数を計数し、サブサンプル#1とサブサンプル#2とした。サブサンプル#1に pGEM-3Z Vector を  $1 \times 10^5$  (100,000) コピーを添加した。2つのサブサンプル(サブサンプル#1およびサブサンプル#2)から、DNeasy Power Soil Kit 使用してDNAを抽出した。抽出したDNAはRNase-free Waterで溶出した。サブサンプル#2には、DNA抽出後に  $1 \times 10^5$  (100,000) コピーの pGEM®-3Z Vector を添加した。サブサンプル#1およびサブサンプル#2は、全量が100  $\mu$ lになるようにDNAを回収した。

*Aplanochytrium* の培養株から抽出したDNAを鋳型とするため、高い特異性は必要ないと判断し、*Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを使用せず、特異的プライマーセットのみで1細胞あたりのコピー数の算出を定量した。

低コピー数の検出が可能な Power SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。1  $\mu$ l の DNA, 0.1  $\mu$ l の *Aplanochytrium* 属特異的プライマーセット (10 pmol/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l の Power SYBR® Green Master Mix, 8.9  $\mu$ l の RNase-free Water の組成で反応液を調整した。反復数は 2 で行った。定量 PCR は, 50°C で 2 分間を 1 サイクル, 95°C で 2 分, 95°C で 15 秒, 55°C で 30 秒の 3 ステップを 40 サイクルの条件で行った。定量 PCR 機器は StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

同時に, 検量線 [standard curve] を作製した。サブサンプル#1 とサブサンプル#2 に内部標準として添加したプラスミド DNA を定量するために, 内部標準として添加したプラスミド DNA である pGEM-3Z Vector を鋳型として使用した検量線を作製した。また, サブサンプル #1 に含まれる *Aplanochytrium* 系統群の「暫定的な」コピー数を定量するために, *Aplanochytrium* の 18S rDNA 領域を組み込んだプラスミド DNA を鋳型として使用した検量線を作製した。いずれの場合も, 10 倍希釈を行い, 10~1,000,000 ( $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ ) になるように 6 段階の希釈系列を作製した。

#### 1.4. *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度の推定

条件検討の結果, 野外サンプルからの DNA 抽出には DNeasy PowerSoil Kit が最も有効であることが明らかになった。そこで, DNeasy PowerSoil Kit で抽出した DNA を使用し, 定量 PCR によって *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を定量することにした。最初にサブサンプルをホモジナイザーペッスル (BIO-BIK) で 1 分間ホモジナイズし, 製品に添付されている使用法の指示に従って使用した。

*Aplanochytrium* 系統群の細胞密度の推定は夾雑物を含む野外サンプルを対象とするため, 高い特異性が必要である。そこで, *Aplanochytrium* 属特異的プライマーセットと *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを使用して *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を定量した。

夾雑物の影響を受けにくい TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。2  $\mu$ l の DNA, 1.8  $\mu$ l の *Aplanochytrium* 属特異的プライマーセット (10 pmol/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l の *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブ, 10  $\mu$ l の TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0, 18  $\mu$ l の RNase-free Water の組成で反応液を調整した。反復数は 4 で行い, 最大値と最小値を除いた値を実測値とした。定量 PCR は, 50°C で 2 分間を 1 サイクル, 95°C で 10 分を 1 サイクル, 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分の 2 ステップを

40 サイクルの条件で行った。定量 PCR 機器は StepOnePlus Real-Time PCR Systems を使用した。

同時に、検量線を作製した。サブサンプル#1 とサブサンプル#2 に内部標準として添加したプラスミド DNA を定量するために、内部標準として添加したプラスミド DNA である pGEM-3Z Vector を鋳型として使用した検量線を作製した。また、サブサンプル#1 に含まれる *Aplanochytrium* 系統群の「暫定的な」コピー数を定量するために、*Aplanochytrium* の rDNA 領域を組み込んだプラスミド DNA を鋳型として使用した検量線を作製した。いずれの場合も、10 倍希釈を行い、 $10 \sim 1,000,000$  ( $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ ) になるように 6 段階の希釈系列を作製した。

## 2.結果

### 2.1.定量 PCR による細胞密度の推定に向けた取り組み

#### 2.1.1.*Aplanochytrium* 属特異的プライマーの特異性の確認

*Aplanochytrium* の 18S rDNA 領域を対象とした特異的なプライマーを表 4-1 に示す。フォワードプライマー [forward primer] は標的としていないヤブレッツボカビ類と 3 塩基以上のミスマッチをもつように設計し、*Aplanochytrium* 属特異的なプライマーとした。リバースプライマー [reverse primer] は真核生物に共通である。

プライマーの特異性を評価するため、PCR アガロースゲル電気泳動によって、標的とする生物群である *Aplanochytrium* の DNA のみが増幅しているか確認した。その結果、すべての *Aplanochytrium* [*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107), *Aplanochytrium* sp. (SEK602, SEK717, SEK755, SEK756)] ではバンドを確認したが、標的としていないヤブレッツボカビ類ではバンドは確認されなかった (図 4-5)。しかしながら、米国生物工学情報センターに登録されている塩基配列あるいはアミノ酸配列に対する相同性検索である BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) の結果、フォワードプライマーの配列が珪藻 (*Coscinodiscus* sp.) と一致した (表 4-4)。リバースプライマーが真核生物に共通であることから、*Coscinodiscus* を検出してしまう可能性があるため、プライマーの特異性を高めるために *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを設計した (図 4-4)。

#### 2.1.2.定量 PCR に適した DNA 抽出法

環境サンプルには、微生物や他の化学物質 (例えば有機酸または多糖類) などの夾雑物が混入しており、PCR 増幅を阻害する可能性がある (Nakai et al. 2013)。そこで、定量 PCR に適した DNA 抽出法を検討した。

環境サンプルから 4 種類の方法で DNA を抽出し、特異的プライマーを用いて定量 PCR で *Aplanochytrium* のコピー数を定量した。その結果、CTAB 法は 401.5 copies/L, ISOPLANT II は、608.1 copies/L, DNeasy PowerSoil Kit は 848.7 copies/L, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出法は検出限界以下であった (図 4-6)。

DNeasy PowerSoil Kit で抽出した DNA から検出された *Aplanochytrium* 系統群のコピー数が最も多いことから、定量 PCR の検出感度が高いことが明らかになった。本研究では、

DNeasy PowerSoil Kit を使用して DNA を抽出し、定量 PCR を行うこととした。

### 2.1.3.検量線の作製

内部標準として添加したプラスミド DNA を定量するために、pGEM-3Z Vector を鋳型として使用した検量線を作製した。pGEM-3Z Vector 特異的プライマーセットのみを使用した場合と、pGEM-3Z Vector 特異的プライマーセットと pGEM-3Z Vector 特異的 TaqMan プローブを使用した場合の検量線をそれぞれ図 4-7 Aa, Ab に示す。いずれの場合も、検出限界はおおよそ 10 コピーであった。

また、サブサンプル#1 に含まれる *Aplanochytrium* 系統群の「暫定的な」コピー数を定量するために、*Aplanochytrium* の 18S rDNA 領域を組み込んだプラスミド DNA を鋳型として使用した検量線を作製した。*Aplanochytrium* 属特異的プライマーセットのみを使用した場合と、*Aplanochytrium* 属特異的プライマーセットと *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを使用した場合の検量線をそれぞれ図 4-7 Ba, Bb に示す。いずれの場合も、検出限界はおおよそ 10 コピーであった。

いずれの場合も、鋳型を添加しない場合（ネガティブコントロール）は、検出限界以下であった。

### 2.1.4.*Aplanochytrium* の 1 細胞あたりのコピー数

定量 PCR で定量された *Aplanochytrium* の 18S rDNA コピー数を細胞数に変換するため、*Aplanochytrium* の 1 細胞あたりのコピー数を求めた (Hariganeya et al. 2013, 図 4-2)。*Aplanochytrium* 9 株の 1 細胞あたりの 18S rDNA コピー数を表 4-5 に示す。9 株の 18S rDNA の 1 細胞あたりのコピー数の範囲は 150~980 コピーであり、*Aplanochytrium* 内における 18S rDNA コピー数が 6 倍であった。

## 2.2.大阪湾に生息する *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度

### 2.2.1.大阪湾の環境データ

2017年5月から2018年4月にかけての環境データを表4-6に示す。

水温は、湾中央の表層水（以下8S）が8.8~29.0°C（平均18.5°C），湾中央の底層水（以下8B）が9.1~25.1°C（平均17.1°C），湾奥の表層水（以下15S）が8.3~27.5°C（平均18.2°C），湾奥の底層水（以下15B）が9.2~24.9°C（平均17.0°C）で変動していた。クロロフィル *a* 濃度は8Sが0.63~12.77 μg/L（平均3.26 μg/L），15Sが2.05~42.25 μg/L（平均14.89 μg/L）で変動していた。8Sと15Sはともに1年間を通して20倍に変動している。塩分は8Sが28.56~32.56 PSU（平均31.35 PSU），8Bが31.51~33.74 PSU（平均32.40 PSU），15Sが15.10~31.46 PSU（平均26.92 PSU），15Bが31.47~33.25 PSU（平均32.24 PSU）で変動していた。以上の環境データは、2011年から2013年にかけて同じ海域で行われたサンプリング調査で計測された値と同程度であった（Ueda et al. 2015, 2014年度 甲南大学大学院 博士後期課程修了 上田 真由美氏 博士学位論文）。

### 2.2.2.大阪湾に生息する *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度

2016年3月から、大阪湾の湾中央と湾奥においてサンプリング調査を行った。そのうち、2017年7月（夏），10月（秋），2018年1月（冬），4月（春）に採取した表層水と底層水から、*Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を推定した（図4-8, 表4-7）。

#### 2.2.2.1.DNA 回収率

DNA 回収率は、湾中央の表層で8.3~22.7%（平均17.5%），湾中央の底層で11.4~25.7%（平均19.8%），湾奥の表層で9.3~28.1%（平均17.8%），湾奥の底層で9.1~23.1%（平均16.4%）の間で変動した（表4-7）。

#### 2.2.2.2.定量 PCR によって推定された *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度

*Aplanochytrium* 系統群はいずれの季節でも普遍的に存在していた。

細胞密度は、湾中央の表層で 1,240.1~4,352.0 cells/L (平均 2,857.7 cells/L) , 湾中央の底層で 298.2~2,358.4 cells/L (平均 1,361.4 cells/L) , 湾奥の表層で 945.4~57,840.4 cells/L (平均 16,541.3 cells/L) , 湾奥の底層で 1,474.7~19,681.3 cells/L (平均 9,247.7 cells/L) の間で変動した (図 4-8, 表 4-7) 。

10月には湾中央で 4,650.2 cells/L, 湾奥で 77,521.8 cells/L であり、秋に細胞密度が高くなることが明らかになった。このとき、湾中央の表層で 4,352.0 cells/L, 湾奥の表層で 57,840.4 cells/L であり、表層の細胞密度が顕著に高いことが明らかになった。

また、7月には、湾中央の表層が 1,240.1 cells/L, 底層が 2,358.4 cells/L, 湾奥の表層が 5,325.5 cells/L, 底層が 12,756.1 cells/L であり、表層よりも底層の細胞密度が高いことが明らかになった。

### 3.考察

#### 3.1. *Aplanochytrium* 属特異的プライマーの特異性

設計した *Aplanochytrium* 属特異的プライマーの特異性を評価するため、PCR とアガロースゲル電気泳動によって、標的とする生物群である *Aplanochytrium* の DNA のみが増幅しているか確認した。その結果、すべての *Aplanochytrium* [*Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107) , *Aplanochytrium* sp. (SEK602, SEK717, SEK755, SEK756) ] ではバンドを確認したが、標的としていないヤブレッツボカビ類ではバンドは確認されなかった(図 4-5)。このことから、*Aplanochytrium* 属特異的プライマーセットを用いた定量 PCR によって、環境サンプル中の *Aplanochytrium* 系統群を特異的に検出・定量することが可能であると判断した。

しかしながら、BLAST 相同性検索の結果、フォワードプライマーの配列が珪藻 (*Coscinodiscus* sp.) と一致した(表 4-4)。リバープライマーが真核生物に共通であることから、*Coscinodiscus* を検出してしまう可能性がある。そこで、プライマーの特異性を高めるために *Aplanochytrium* 属特異的 TaqMan プローブを設計した(図 4-4)。

#### 3.2. 定量 PCR に適した DNA 抽出法の検討

これまでに定量 PCR によるラビリンチュラ類の現存量調査が行われている(Nakai et al. 2013)。この研究では、2 L もしくは 20 L の海水をろ過したフィルターからフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出法で DNA 抽出し、7 属の特異的プライマーを用いて 212 のサンプルからヤブレッツボカビ類の細胞密度が推定された。しかし、ヤブレッツボカビ類を検出できたサンプルは、212 サンプルのうちわずか 7 サンプルであった。同時に行われたアクリフラビン直接計数法では 212 サンプルのうち 104 サンプルからヤブレッツボカビ類を検出できた。環境サンプルに混入している夾雑物によって PCR 増幅が阻害されたため、ヤブレッツボカビ類が検出されたサンプルが少なかったと推測された(Nakai et al. 2013)。特に、2 L もしくは 20 L という大量の海水から DNA を抽出したことから、夾雑物の影響が大きかったと推測した。

大阪湾で採取したサンプルにも *Aplanochytrium* 以外の海洋微生物や陸上植物、泥などの夾雑物が混入していた。そこで、夾雑物の影響を受けにくく、より検出感度が高くなるような条件を検討した。

まず、サンプルとする海水の量を検討した。その結果、500 ml という少量の海水から DNA

を抽出した場合でも、*Aplanochytrium* 系統群の DNA を検出できることが明らかになった（データは未掲載）。

次に、定量 PCR に適した DNA 抽出法の適用を検討した。その結果、DNeasy PowerSoil Kit で抽出した DNA から検出された *Aplanochytrium* 系統群のコピー数が最も多く、定量 PCR の DNA 抽出には DNeasy PowerSoil Kit が最も有効であることが明らかになった。

DNeasy PowerSoil Kit は、特に PCR 反応を阻害するフミン酸 [humic acid] を含むサンプルに適している (<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>)。フミン酸は土壌や海水に含まれることが報告されており、環境サンプルからフミン酸を除去するためのさまざまな方法が開発されている (Wilson 1997)。大阪湾で採取したサンプルにもフミン酸が混入していたと考えられるが、DNeasy PowerSoil Kit によってフミン酸の一部を除去できたため、検出感度が上がったと推測された。

### 3.3. *Aplanochytrium* の 18S rDNA のコピー数と他の真核生物との比較

繊毛虫の *Vorticella* の 18S rDNA のコピー数 (61,000~316,000 copies) は、属内で 5 倍以上の差がある (Gong et al. 2013)。また、渦鞭毛藻類の *Ostreopsis* でも 18S rDNA のコピー数 (24,000~270,000 copies) は、属内で 11 倍以上の差がある (Hariganeya et al. 2013)。本研究では、*Aplanochytrium* 内で 6 倍以上の差があると推定され、他の生物群と同程度であった (表 4-5)。

これまでに、環境サンプル由来の細胞と培養株由来の細胞のコピー数を推定、比較した報告がされている。例えば、Perini et al. (2011) は、*Ostreopsis* cf. *ovata* の環境サンプル由来の細胞と培養株由来の細胞のコピー数には、有意な差があることを明らかにした。一方、Hariganeya et al. (2013) は、同じ *Ostreopsis* cf. *ovata* であるにも関わらず、環境サンプル由来の細胞と培養株由来の細胞のコピー数には有意差がないことを示した。このことから、環境サンプルと培養株で *Aplanochytrium* の 18S rDNA のコピー数が異なる可能性を考慮にされる必要があった。しかしながら、ヤブレッツボカビ類を環境サンプルから培養をせずに単離することは難しく、環境中でのヤブレッツボカビ類のコピー数の算出は困難である。そこで、マツ花粉を添加した海水で培養することで環境中の *Aplanochytrium* を再現し、18S rDNA コピー数を定量した (東京慈恵会医科大学 庄野 孝範博士研究員 私信)。その結果、環境中の状態を再現した場合でも、有意差はないことが示された。以上のことから、定量 PCR で定量された *Aplanochytrium* の 18S rDNA コピー数から細胞数に変換する際には、1 細胞あたりのコピー数を 150~980 コピーとして計算を行った。これまで、ラビリンチュラ類の 18S rDNA のコピ

一数に関する情報はなく、本研究で *Aplanochytrium* の rDNA のコピー数の情報を初めて提供した。

### 3.4.これまでのヤブレッツボカビ類の現存量調査との比較

大阪湾における *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を推定した結果、1年間の平均で、湾中央の表層水から 2,857.7 cells/L、湾中央の底層水から 1,361.4 cells/L、湾奥の表層水から平均 16,541.3 cells/L、湾奥の底層水から 9,247.7 cells/L が検出された（表 4-7.）。同じ地点で、2年間にわたってヤブレッツボカビ類の現存量調査が行われており、湾中央の表層水から平均 122.1 cells/L、湾中央の底層水から平均 46.9 cells/L、湾奥の表層水から平均 508.9 cells/L、湾奥の底層水から平均 45.0 cells/L のヤブレッツボカビ類が検出された（Ueda et al. 2015）。本研究の結果は、*Aplanochytrium* 系統群のみにも関わらず、マツ花粉 MPN 法で推定したヤブレッツボカビ類全体の細胞密度を大きく上回った。Ueda et al. (2015) では、マツ花粉 MPN 法によってヤブレッツボカビ類の現存量が推定されている。マツ花粉 MPN 法は、マツ花粉で釣りあげたヤブレッツボカビ類を寒天培地で培養することで、確立的にヤブレッツボカビ類の細胞密度を推定する方法である。この方法は、ヤブレッツボカビ類がマツ花粉への走化性をもつこと、寒天培地上で増殖することが前提となる。そのため、マツ花粉へ走化性をもたない系統群や、ヤブレッツボカビ類の一般的な培地で増殖できない系統群は、細胞密度が過小評価されてしまう。*Aplanochytrium* は、遊走細胞を形成しない系統群が存在する（Bahnweg and Sparrow 1972）。また、他の系統群と比較してヤブレッツボカビ類の一般的な培地である d-GPY で増殖しにくい。このことから、マツ花粉 MPN 法では過小評価されやすい系統群であると考えられる。今回は、マツ花粉 MPN 法ではなく定量 PCR を使用することで、より正確に *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を推定することができた。

これまでに、定量 PCR によってヤブレッツボカビ類の現存量が推定されている（Nakai et al. 2013）。鹿児島県西部の甑島<sup>こしき</sup>、県南部の薩摩硫黄島、種子島、瀬戸内海、三陸の唐桑半島における現存量調査の結果、*Aurantiochytrium* と *Oblongichytrium* が、それぞれ 13,100 cells/L、17,900 cells/L 検出されている。本研究で推定された *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度は、Nakai et al. (2013) で推定された *Aurantiochytrium* と *Oblongichytrium* の細胞密度と同程度であった。

定量 PCR による細胞密度の推定にも問題点がある。近年、今まで知られていなかったヤブレッツボカビ類の系統群が存在することが示唆されている（Collado-Mercado et al. 2010, Li et al. 2013）。系統群ごとに特異的プライマーが必要な定量 PCR は、このような未知のヤブレッツ

ボカビ類を検出・定量することはできない。環境 DNA の網羅的に解析し、プランクトンの群集構造を把握することができる次世代シーケンサーで、どのようなラビリントウ類が生息しているかを把握し、それぞれの系統群について定量 PCR で細胞密度を推定する必要がある。

### 3.5. *Aplanochytrium* 系統群の生産速度の推定

本研究で推定された *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度から、生産速度を推定した(図 4-9)。

まず、湾中央における生産速度を推定した。季節ごとの細胞密度を平均し、*Aplanochytrium* 系統群の1年間の平均細胞密度は、表層で 2,900 cells/L、底層で 1,400 cells/L とした。ラビリントウ類 1 細胞あたりの炭素含有量が  $1.65 \times 10^{-4} \mu\text{g C/cell}$  である (Kimura et al. 1999)。よって、*Aplanochytrium* 系統群の炭素量バイオマスは、表層と底層でそれぞれ  $0.48 \text{ mg C/m}^3$ 、 $0.23 \text{ mg C/m}^3$  であると推定された。また、*Aplanochytrium* 系統群の増殖率 [growth rate] を 1.2/d と仮定すると、表層で  $0.57 \text{ mg C/m}^3/\text{d}$ 、底層で  $0.28 \text{ mg C/m}^3/\text{d}$  と推定された。さらに、湾中央の水深は 32m であることから、 $4.96 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  であると推定された。

同様の方法で湾奥における *Aplanochytrium* 系統群の生産速度を推定した *Aplanochytrium* 系統群 1 年間の平均細胞密度は、表層で 17,000 cells/L、底層で 9,200 cells/L とした。水深が 18m なので、生産速度は  $17.05 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  であると推定された。

### 3.6. *Aplanochytrium* 系統群の季節的な鉛直移動

季節ごとの細胞密度を推定することで、*Aplanochytrium* 系統群が年間を通して普遍的に存在することが明らかになった。

珪藻や渦鞭毛藻類は大繁殖するブルーム [bloom] と呼ばれる現象が起こることが知られている。例えば、大阪湾では渦鞭毛藻類の *Alexandrium tamarense* や *Prorocentrum minimum*、*Heterocapsa triquetra*、*Heterocapsa rotundata* などの渦鞭毛藻類が生息しており、ブルームが発生したことが報告されている (Yamamoto et al. 2013)。

ブルームでは、*A. tamarense* の細胞密度は 200 cells/L にまで増殖し、二枚貝に蓄積している麻痺性貝毒 [paralytic shellfish poisoning : PSP] も急増した。*A. tamarense* は 1 ヶ月も経たないうちに姿を消し、二枚貝に蓄積している麻痺性貝毒も減少した。このように、*A. tamarense* は一定期間しか海洋生態系に影響を与えることができない。一方の *Aplanochytrium* は、年間を通して普遍的に存在することから、海洋生態系に与える影響も一年

間におよぶと推測される。

また、*Aplanochytrium* 系統群の細胞密度は、1年間を通して顕著な増減がみられ、さらに表層と底層で鉛直移動していることが示唆された。これまでに、年間を通したクロロフィル *a* 量の調査が行われており、3月の春のブルームで発生した植物プランクトンは、4月から7月にかけて底層に沈降することが報告されている (Taniuchi et al. 2015, Watanabe et al. 2017)。また、大阪湾では7月(夏)に表層水温と底層水温に差があり、水温躍層が形成されている(表4-6)。このことから、大阪湾では春から冬にかけて対流が起こり、表層水と底層水が循環していると考えられる。以上のことから、*Aplanochytrium* 系統群の季節的に鉛直移動していると仮説を立てた(図4-10)。春になると海面温度が上昇し、豊富な栄養塩を利用して、植物プランクトンのブルームが発生する(春のブルーム)。*Aplanochytrium* は、表層付近の植物プランクトンから栄養を摂取し、表層付近では細胞密度が高くなる。また、栄養摂取の過程で *Aplanochytrium* と植物プランクトンは集合体を形成する。以上のことから、*Aplanochytrium* は、表層付近の植物プランクトンから栄養を摂取し、表層付近では細胞密度が高くなると考えられる。また、栄養摂取の過程で *Aplanochytrium* と植物プランクトンは集合体を形成し、一部の集合体は沈降すると推測される。夏になると、春のブルームが収束し、一部の植物プランクトンは底層に沈降する。植物プランクトンから栄養摂取していた *Aplanochytrium* は植物プランクトンとともに底層に沈降する。また、沈降した *Aplanochytrium* は底層で増殖すると考えられる。以上のことから、夏は底層での *Aplanochytrium* の細胞密度が高くなると推測される。秋は海面が冷却され始めるため、表層水が重くなり、栄養塩が豊富な中層および底層との間に上下混合が起こる。さらに、植物プランクトンのブルームが発生する(秋のブルーム)。DHAの比重は0.950と小さいため、夏に植物プランクトンから栄養を摂取することでDHAを蓄積した *Aplanochytrium* は、比較的海水に浮きやすいと考えられる。*Aplanochytrium* は大量発生した植物プランクトンから栄養を摂取し、表層付近では細胞密度が高くなる。海水が循環しているので、表層の *Aplanochytrium* の一部は底層に沈降する。冬になると、日射量が不足し水温が低下するため、秋のブルームが収束する。水温の低下によって海水の循環が活発になるため、表層の *Aplanochytrium* の一部は底層に沈降する。

サンプリングが行われた2017年10月3日には秋のブルームが発生しておらず、*Aplanochytrium* の細胞密度が高くなった理由は不明である(表4-6)。しかしながら、サンプリング日より以前(2017年9月27日から10月2日)に、周辺海域のクロロフィル *a* 濃度が上昇しており(大阪湾水質定点自動観測データ配信システム(近畿地方整備局神戸港湾空港技術調査事務所; <http://222.158.204.199/obweb/index.aspx>; 図4-11)、この時期に発生した植物プランクトンから栄養を摂取し増殖していたと推測された。また、*Aplanochytrium* が死滅した *Skeletonema* から栄養を摂取し、増殖する様子を観察しており、分解者としての役割を

もつことが明らかになった（データは未掲載）。このことから、生きている植物プランクトンが多い時期は生きている植物プランクトンから栄養を摂取する“消費者”として、少ない時期は植物プランクトンの死骸などの海洋由来のデトリタスから栄養を摂取する分解者として機能している可能性が考えられた。*Aplanochytrium* 系統群の細胞密度と懸濁態有機物の相関を調査する必要がある。

河口域では、ヤブレッツボカビ・スパイクと名付けられた、ヤブレッツボカビ類の細胞密度は春から晩夏にかけて急激に増減する現象が報告されている（Ueda et al. 2015）。この現象は、春の急激な水温上昇と降雨による塩分の低下によって活発化し発生すると推測されている。また、これまでに2種類のヤブレッツボカビ類（*Aurantiochytrium* と *Sicyoidochytrium*）に感染するウイルスの存在が報告されている（Takao et al. 2005, 2006, 2007b）。このように、ヤブレッツボカビ類の細胞数が増減する要因は多様である。また、系統群によっても違いがあると予想される。1年間を通したデータやさまざまな海域でのデータの蓄積、他のヤブレッツボカビ類のデータが不可欠である。

### 3.7. *Aplanochytrium* による高度不飽和脂肪酸の供給

*Aplanochytrium* を含むラビリンチュラ類は、高度不飽和脂肪酸、特に DHA を合成・蓄積する（Nakahara et al. 1996, Lewis et al 1999, Fan et al. 2000, Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Kaya et al. 2011, Nakazawa et al. 2014）。海産魚類も DHA と EPA を蓄積しているが、体内で合成できないため必須脂肪酸として餌から取り入れる必要がある（Tocher 2010）。

これまでに、さまざまな藻類や原生生物を含むさまざまな生物群の脂肪酸組成が調べられており、EPA をより高濃度に蓄積する生物群、DHA をより高濃度に蓄積する生物群に分けることができる。EPA をより高濃度に蓄積する生物群として、珪藻が挙げられる（Zhukova and Aizdaicher 1995, Brown et al. 1997）。珪藻は海洋の主要な一次生産者であることから、珪藻が魚類の EPA の蓄積に大きく関与していると予測される。一方、DHA をより高濃度に蓄積する生物群として、渦鞭毛藻類、ラビリンチュラ類が挙げられる。渦鞭毛藻類の大きさは、特に大きなものを除くと 10~100  $\mu\text{m}$  である。一般的に被食者と捕食者の大きさの比が 1:10 であることを考慮に入れると（Azam et al. 1983）、絨毛虫やカイアシ類のような 100~1,000  $\mu\text{m}$  の大きさの動物プランクトンが捕食できる大きさである。また、渦鞭毛藻類はおおよそ 300 属 2,000 種以上もの現生種が存在し、沿岸域から外洋まで世界中の海洋に広く分布している（Gómez 2012）。以上のことから、渦鞭毛藻類が DHA の供給源として重要な役割を担ってい

ると考えられる。ヤブレッツボカビ類の大きさはおよそ 5~20  $\mu\text{m}$  であるが、コロニーや植物プランクトンとの集合体を形成した場合、動物プランクトンが捕食できる大きさになる。実際、動物プランクトンの消化管からヤブレッツボカビ類 (*Aplanochytrium*) が分離・検出されている (Raghukumar and Raghukumar 1999, Damare and Raghukumar 2006, 2010, Hirai et al. 2018)。ヤブレッツボカビ類が世界中の海洋に存在していることから (Ulken 1986, Kimura et al. 1999, Raghukumar et al. 2001, Bongiorno et al. 2004, Naganuma et al. 2006), ヤブレッツボカビ類は動物プランクトンや魚類の DHA 供給源の候補の 1 つとして、その影響力を調査する必要があるといえる。

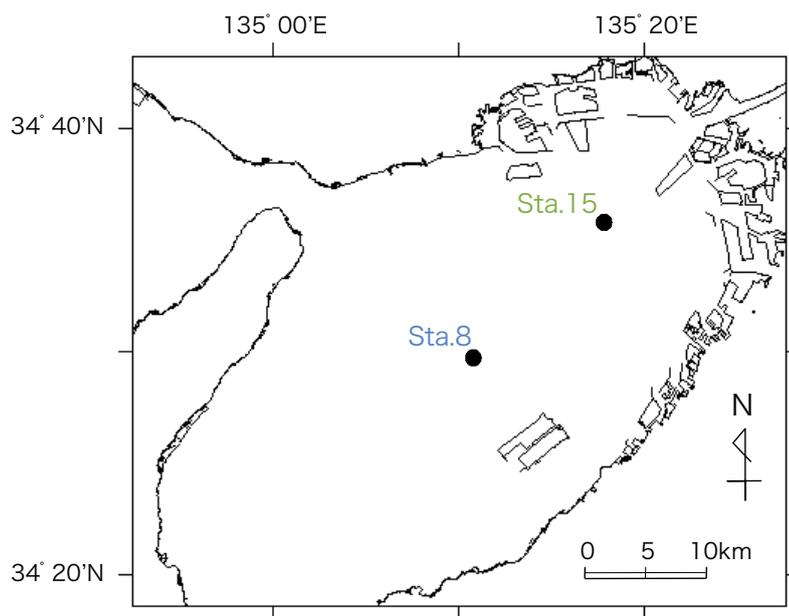


図4-1.サンプリング地点

大阪湾の湾中央に位置するStation 8（図中，Sta. 8）と，湾奥に位置するStation 15（図中，15）で行った。湾奥は，淀川河口からおよそ 15 km 離れており，降雨による河川水の出水の影響を受けやすい場所である。一方，湾中央は淀川河口からおよそ 30 km 離れており，河川水の影響をほとんど受けない場所である。

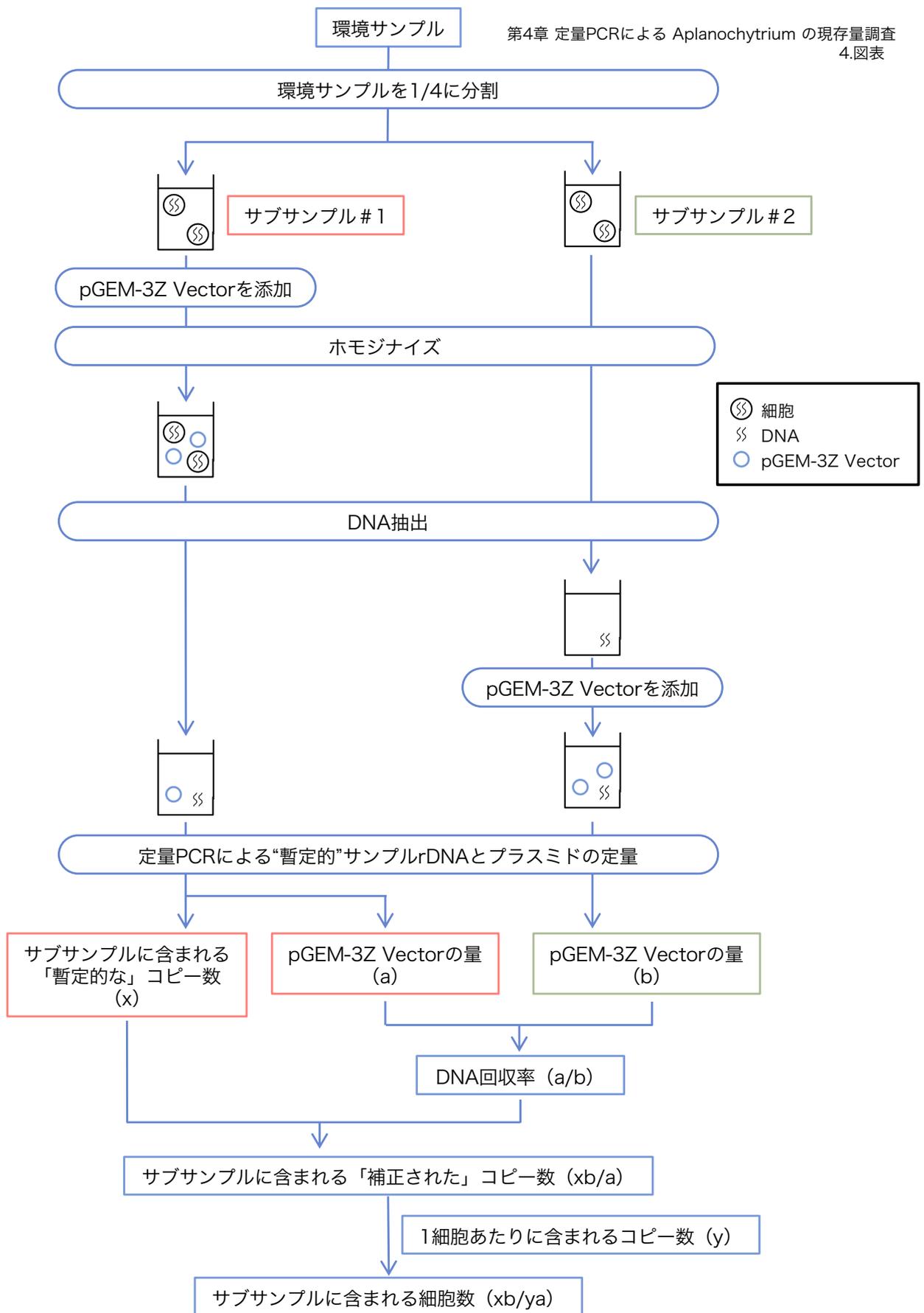


図4-2.DNA回収率を考慮した定量PCRの概要 (Hariganeya et al. 2013 改変)

サブサンプル#1にはDNA抽出前 (a) に、サブサンプル#2にはDNA抽出後 (b) にプラスミド (pGEM<sup>®</sup>-3Z) を添加する。プラスミドのコピー数を定量することでDNA回収率を算出する (a/b)。サブサンプル#1の *Aplanochytrium* の「暫定的な」コピー数 (x) を定量し、DNA回収率で除することで、「補正された」コピー数を算出することができる (xb/a)。

	Aplanochytrium -F	Aplanochytrium -R
	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>Aplanochytrium</i> 属		
SC1-1	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
PR1-1	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
PR-12-3	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
PR15-1	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
PR24-1	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
SC24-1	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>A. kerguelense</i>	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>A. minutum</i>	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>A. stocchinoi</i>	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
SEK717	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
SEK602	CC <b>TTGGTTGAAAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>Oblongichytrium</i> 属		
SEK710	CC <b>TTGGCTGAGAAGCCTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>
<i>Schizochytrium</i> 属		
SEK7346	CC <b>TGGGCCGGAAGGTTTGGG</b>	ACCGGACCA <b>TTCAATCGG</b>

図4-3. *Aplanochytrium* 属特異的プライマーの設計

米国生物工学情報センターが提供している塩基配列データベースであるGenBankに登録されている9配列、培養株からDNAを抽出して配列決定した2配列、合計11配列のアライメントをとり、PCRプライマーセットを設計した。

Aplanochytrium -TaqMan	
	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
<i>Aplanochytrium</i> 属	
SC1-1	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
PR1-1	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
PR-12-3	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
PR15-1	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
PR24-1	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
SC24-1	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
<i>A. kerguelense</i>	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
<i>A. minutum</i>	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
<i>A. stocchinoi</i>	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
SEK717	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
SEK602	ACCCTTGCAATTATTGGTCT
<i>Oblongichytrium</i> 属	
SEK710	ATTATTGCAATTATTAATCT
<i>Schizochytrium</i> 属	
SEK7346	ATCTTTGCAATTATTGATCT

図4-4. *Aplanochytrium* 属特異的TaqMan プローブの設計

米国生物工学情報センターが提供している塩基配列データベースであるGenBankに登録されている9配列、培養株からDNAを抽出して配列決定した2配列、合計11配列のアライメントをとり、TaqMan プローブを設計した。



図4-5. *Aplanochytrium* 属特異的プライマーセットの特異性の確認

*Aplanochytrium* 属特異的プライマーの特異性を確認するために, *Aplanochytrium* 培養株5株と他属のヤブツボカビ類の培養株9株, 外群2株を対象としてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動によって, *Aplanochytrium* 属のDNAのみが増幅しているかを確認した。

1. *Aurantiochytrium limacinum* (SR21)
2. *Parietichytrium sarkarianum* (SEK351)
3. *Botryochytrium radiatum* (SEK597)
4. *Ulkenia amoiboidea* (SEK615)
5. *Thraustochytrium aureum* (ATCC34304)
6. *Schizochytrium aggregatum* (SEK576)
7. *Sichydochytrium* sp. (NBRC 102979)
8. *Oblongichytrium* sp. (SEK347)
9. *Thraustochytrium striatum* (SEK533)
10. *Aplanochytrium kergelence* (KMPB N-BA-107)
11. *Aplanochytrium* sp. (SEK602)
12. *Aplanochytrium* sp. (SEK717)
13. *Aplanochytrium* sp. (SEK755)
14. *Aplanochytrium* sp. (SEK756)
15. *Heterosigma akashiwo* (SEK293)
16. *Ochromonas danica* (SEK368)

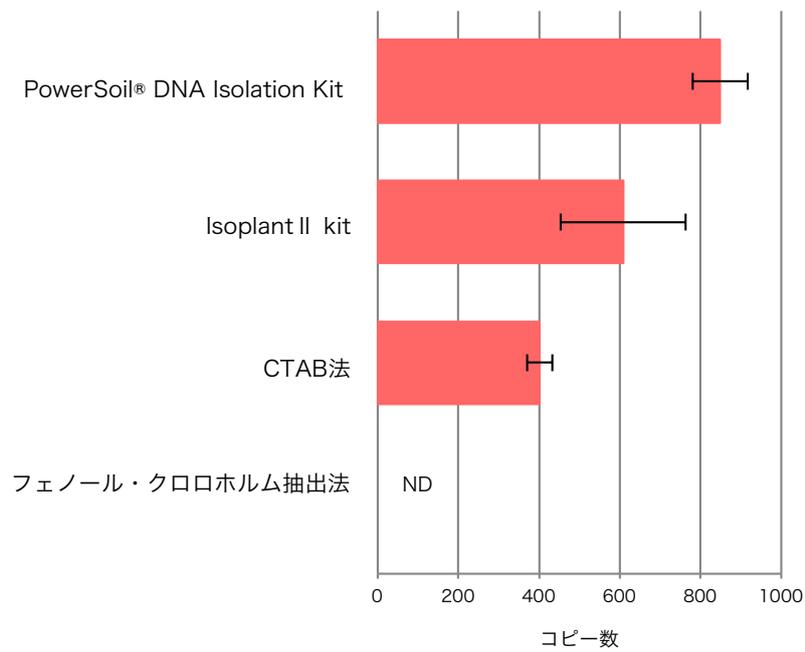


図4-6.環境サンプルから *Aplanochytrium* を検出するためのDNA抽出法の検討

定量PCRに適したDNA抽出法を決定した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出法、CTAB法、ISOPLANT II (NIPPON GENE) およびDNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN) の4種類の方法で野外サンプルからDNAを抽出し、定量PCRで定量された *Aplanochytrium* のコピー数の比較を行った。

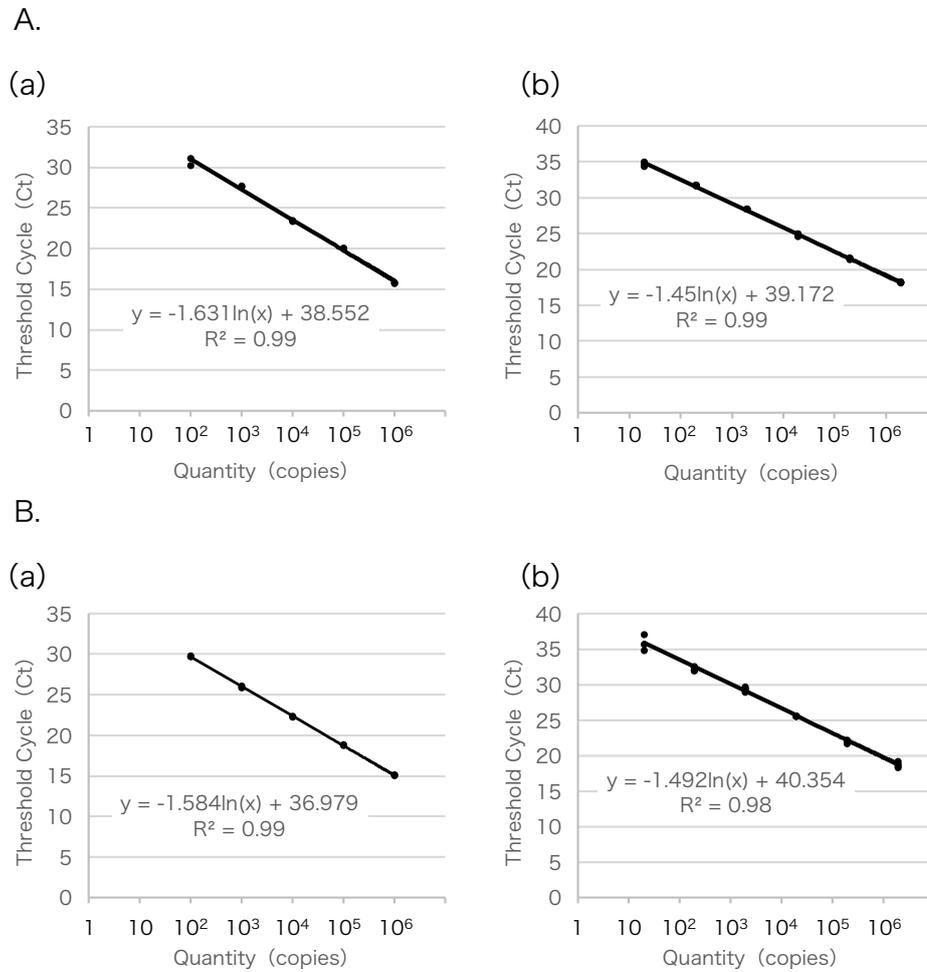


図4-7.定量PCRで使用するプラスミドの検量線

10倍希釈で6段階の希釈系列を調整し、検量線を作成した。

A. DNA回収率を算出ために添加したpGEM-3zの検量線

(a) pGEM-3z-F/R (b) pGEM-3z-F/RとpGEM-3z-Taq Man

B. *Aplanochytrium kerguelense* (KMPB N-BA-107) の18S rDNA配列を含むプラスミドの検量線

(a) *Aplanochytrium*-F/R (b) *Aplanochytrium*-F/Rと*Aplanochytrium*-Taq Man

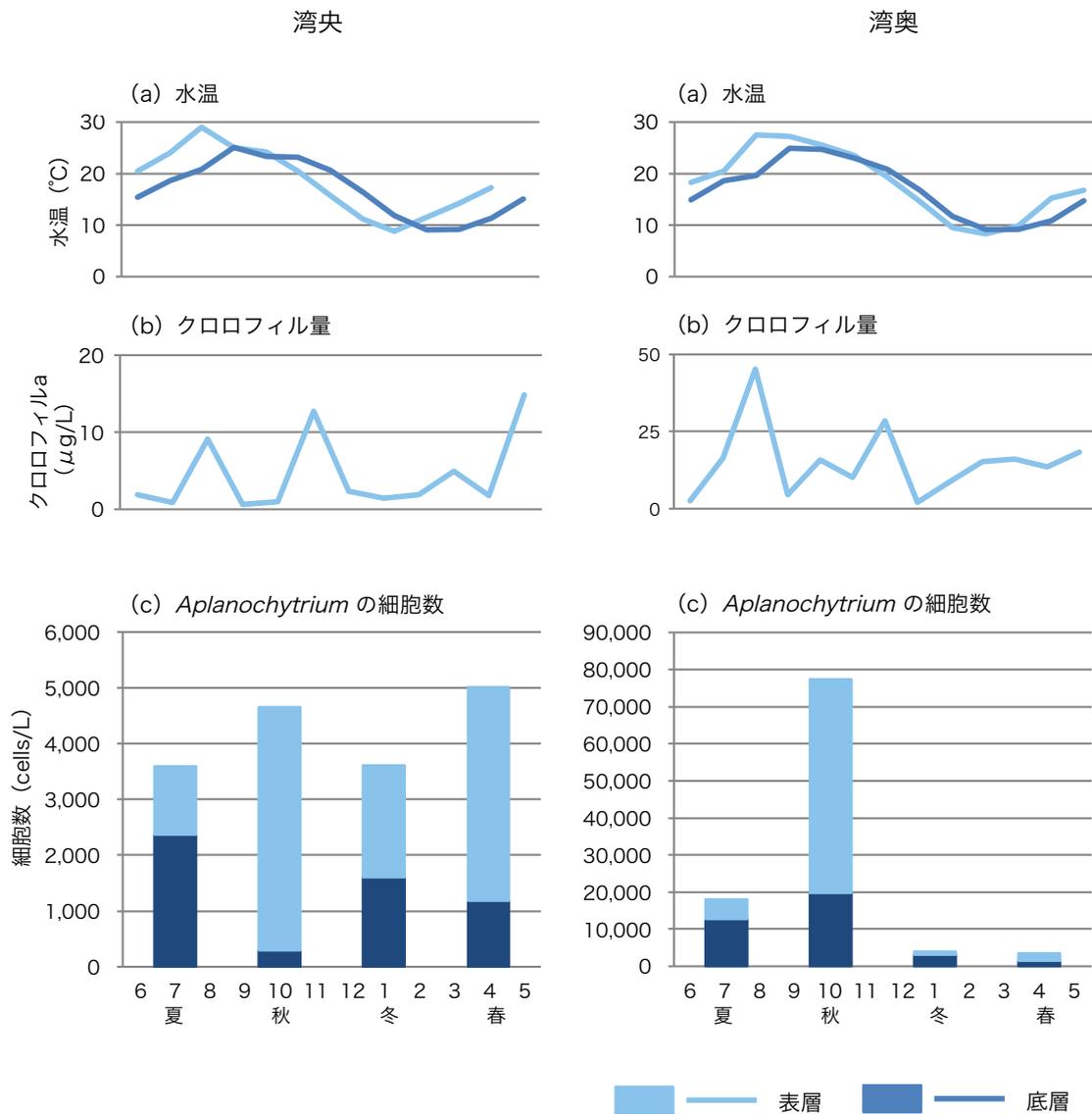


図4-8.定量PCRによって推定された*Aplanochytrium* の細胞密度と環境データ

- (a) 水温
- (b) クロロフィル量
- (c) 定量PCRによって推定された*Aplanochytrium* の細胞密度

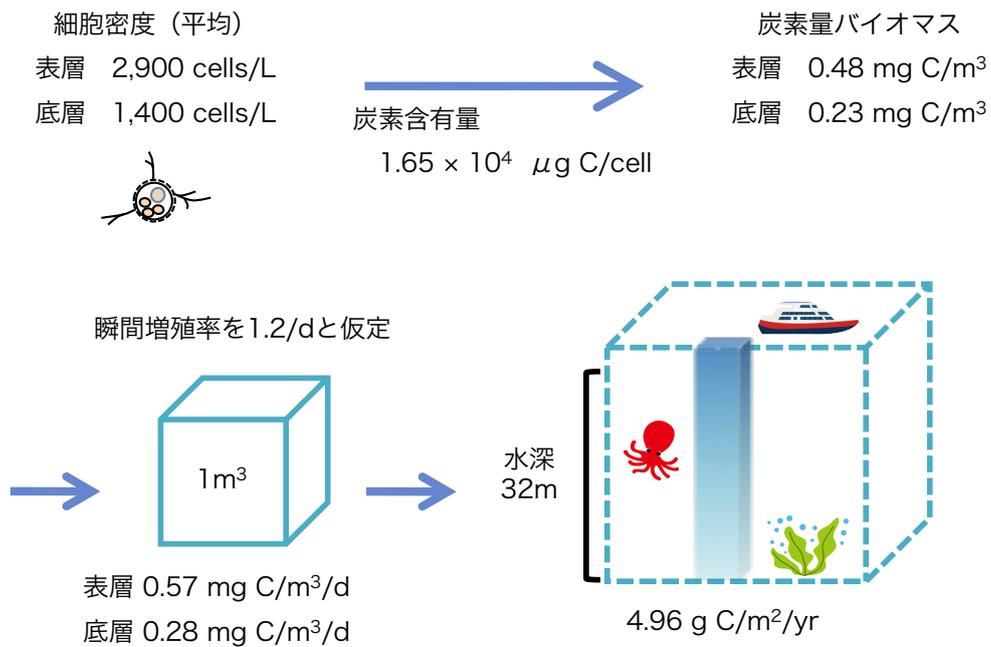


図4-9.湾央における *Aplanochytrium* の生産速度

ラビリンチュラ類1細胞あたりの炭素含有量から、*Aplanochytrium* の炭素量バイオマスを推定した。また、*Aplanochytrium* の増殖率を1.2/dと仮定し、1日の1m<sup>3</sup>あたりの生産速度を推定した。さらに、水深から1年間の1m<sup>2</sup>あたりの生産速度を推定した。

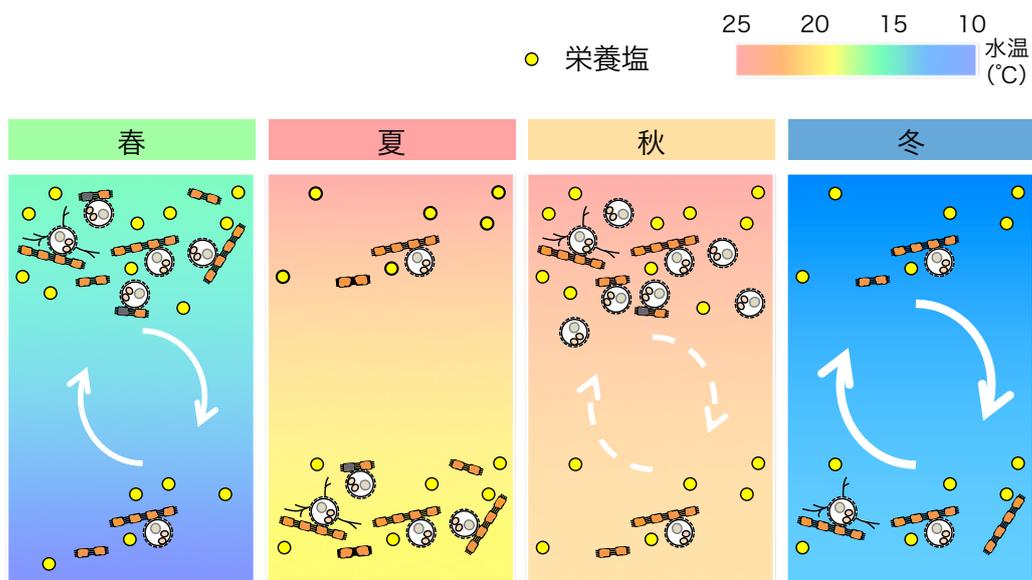


図4-10. *Aplanochytrium* の細胞密度から推測された、季節的な変動

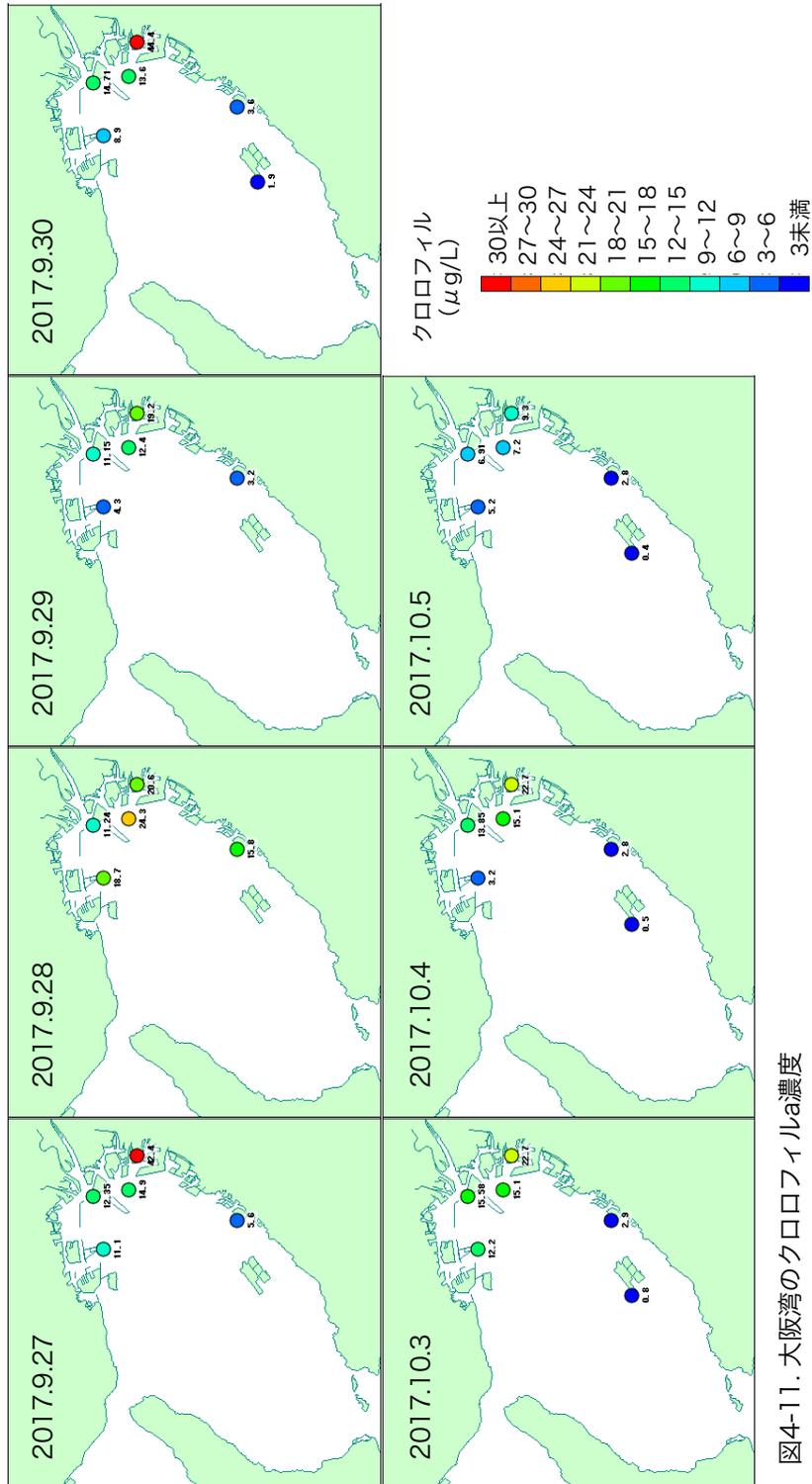


図4-11. 大阪湾のクロロフィルa濃度

大阪湾水質定点自動観測データ配信システム（近畿地方整備局神戸港湾空港技術調査事務所；  
<http://222.158.204.199/obweb/index.aspx>）によって公開されている2017年9月27日から  
10月2日における大阪湾のクロロフィルa濃度。

表4-1. *Aplanochytrium* の定量PCRに使用したプライマーとTaqManプローブ

標的とするDNA	プライマー名	配列 (5'-3')	蛍光色素	Tm	Enhancer	精製方法
pGEM-3z Vector	pGEM-3z-F	CGGCATCAGAGCAGATTGTA				
	pGEM-3z-R	CTGGCGTAATAGCGAAGAGG				
	pGEM-3z-TaqMan	AGAAAATACCGCATCAGG	FAM		MGB	HPLC精製
<i>Aplanochytrium</i> 系統群	Aplanochytrium-F	CCTTGGTTGAAAAGCCTGGG				
	Aplanochytrium-R	ACCGGACCATTCAATCGG				
	Aplanochytrium-TaqMan	ACCCTTGCAATTATTGGTCT	FAM		MGB	HPLC精製

MGB : Minor Groove Binder

表4-2.LB培地の組成

	濃度 (%)
トリプトン [Trypton]	1.0
乾燥酵母エキス [Extract Yeast Dried]	0.5
塩化ナトリウム [Sodium Chloride ; NaCl]	1.0
寒天末 [Agar, powder]	1.5
イオン交換水 [distilled water]	100

121°C 20分間 オートクレーブ滅菌処理

アンピシリンナトリウム塩 [Ampicillin sodium salt]	最終濃度：100mg/ml
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside)	最終濃度：20mg/ml
IPTG (dioxane free) (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)	最終濃度：100mg/ml

表4-3. コピー数の定量のために使用した *Aplanochytrium*

株番号	株番号	株番号	属	培養温度 (°C)	サンプリング地点	引用文献
SEK number	NBRC number	Original number				
		KMPB N-BA-107	<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	25	インド南部	Honda et al. (1999)
SEK602		376-05m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	20	日本 兵庫県 神戸市 六甲アイランド	Ueda et al. (2015)
SEK603	NBRC 110844	465-05m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 西宮市 夙川河口	Ueda et al. (2015)
SEK717		1110-8S-01m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
SEK753		1607-d-15S-01y	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	
SEK754		1209-15B-01m	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 兵庫県 神戸市沖 大阪湾	Ueda et al. (2015)
SEK755		Y01-Dc-01d	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 沖縄県 石垣市 宮良川	
SEK756		Y06-T30p-18d	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 沖縄県 八重山郡 浦内川	
SEK757		h10-ulvp-144kt	<i>Aplanochytrium</i> sp.	25	日本 北海道 厚岸郡 霧多布湿原	

表44 *Aplanochytrium* 属特異的プライマーのBLAST相同性検索の結果

配列名	同一性 Identities (%)
Uncultured eukaryote clone DDI280.fa small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured eukaryote clone DDI254.fa small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i> isolate BH41_43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured fungus DGGE-F35-3 gene for 18S rRNA, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium</i> sp. APKK3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium</i> sp. APKK2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium</i> sp. SEK 717 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium</i> sp. SEK 603 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	100
<i>Coscinodiscus</i> sp. TN-2014 isolate ECT3850CoscinoHlconvex 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Aplanochytrium</i> sp. ANT10.3 partial 18S rRNA gene, isolate on ANT10.3	100
Uncultured eukaryote clone SGYX510 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Coscinodiscus</i> sp. 1 MPA-2013 isolate CVPan4Cosc 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured eukaryote clone CC02A740.067 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured eukaryote clone CC02A105.056 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Uncultured stramenopile clone 905st23-36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

表4-5. *Aplanochytrium* の1細胞あたりのr18S コピー数

株番号	属	rDNA コピー数 (copies/cell)
SEK753	<i>Aplanochytrium</i> sp.	150 ± 50
KMPB-N-BA 107	<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	190 ± 20
SEK754	<i>Aplanochytrium</i> sp.	400 ± 220
SEK755	<i>Aplanochytrium</i> sp.	450 ± 230
SEK757	<i>Aplanochytrium</i> sp.	480 ± 160
SEK602	<i>Aplanochytrium</i> sp.	580 ± 130
SEK717	<i>Aplanochytrium</i> sp.	790 ± 230
SEK756	<i>Aplanochytrium</i> sp.	790 ± 230
SEK603	<i>Aplanochytrium</i> sp.	980 ± 240

表4-6.大阪湾の環境データ

Sta.8-表層					Sta.15-表層				
サンプリング地点	水温 (°C)	クロロフィル (μg/L)	塩分 (PSU)	SiO <sub>2</sub> (μM)	サンプリング地点	水温 (°C)	クロロフィル (μg/L)	塩分 (PSU)	SiO <sub>2</sub> (μM)
2017.5	17.0	0.67	32.31	8.43	2017.5	18.2	2.54	30.36	0.64
2017.6	20.5	1.89	31.11	3.52	2017.6	20.4	16.39	28.19	1.80
2017.7	24.0	0.83	30.11	10.26	2017.7	27.5	45.25	15.1	33.18
2017.8	29.0	9.11	28.56	24.04	2017.8	27.2	4.39	20.6	70.74
2017.9	25.0	0.63	32.56	2.90	2017.9	25.5	15.81	31.46	6.98
2017.10	24.2	0.94	32.49	4.68	2017.10	23.5	10.09	29.24	12.35
2017.11	20.4	12.77	30.92	7.34	2017.11	19.3	28.48	25.82	23.13
2017.12	15.7	2.34	31.82	6.97	2017.12	14.5	2.05	29.41	16.37
2018.1	11.1	1.44	31.83	8.96	2018.1	9.5	8.82	28.33	8.18
2018.2	8.8	1.85	31.90	4.94	2018.2	8.3	15.37	31.35	0.69
2018.3	11.6	4.93	31.19	2.97	2018.3	9.8	16	28.6	12.23
2018.4	14.3	1.73	31.38	7.16	2018.4	15.2	13.54	24.6	8.78
平均	18.5	3.26	31.35	7.68	平均	18.2	14.89	26.92	16.26
最大値	29.0	12.77	32.56	24.04	最大値	27.5	45.25	31.46	70.74
最小値	8.8	0.63	28.56	2.90	最小値	8.3	2.05	15.10	0.64

Sta.8-底層					Sta.15-底層				
サンプリング地点	水温 (°C)	クロロフィル (μg/L)	塩分 (PSU)	SiO <sub>2</sub> (μM)	サンプリング地点	水温 (°C)	クロロフィル (μg/L)	塩分 (PSU)	SiO <sub>2</sub> (μM)
2017.5	15.4		32.44	9.61	2017.5	14.9		32.25	21.275
2017.6	18.6		32.87	14.85	2017.6	18.6		32.73	16.84
2017.7	20.9		32.86	19.04	2017.7	19.7		32.61	59.87
2017.8	25.1		32.63	16.78	2017.8	24.9		32.32	23.93
2017.9	23.3		33.74	8.73	2017.9	24.7		33.25	13.79
2017.10	23.1		32.76	5.19	2017.10	23.0		32.73	9.4
2017.11	20.7		31.51	14.63	2017.11	20.8		31.47	15.98
2017.12	16.4		31.95	7.38	2017.12	16.7		31.82	9.79
2018.1	11.9		32.00	8.90	2018.1	11.8		31.89	8.62
2018.2	9.1		31.86	5.24	2018.2	9.2		31.64	4.89
2018.3	9.2		32.02	7.00	2018.3	9.2		32.11	8.22
2018.4	11.3		32.20	10.26	2018.4	10.9		32.06	13.22
平均	17.1		32.40	10.63	平均	17.0		32.24	17.15
最大値	25.1		33.74	19.04	最大値	24.9		33.25	59.87
最小値	9.1		31.51	5.19	最小値	9.2		31.47	4.89

表4-7.大阪湾の2017年5月から2018年4月までの *Aplanochytrium* の細胞密度

コピー数 (copies/250ml) : 定量PCRの実測値

DNA回収率 (%) : 算出されたDNA回収率

実際のコピー数 (1000ml) : コピー数 (250ml) をDNA回収率で除した。

細胞数 (min:コピー数980) :

回収率を考慮したコピー数を *Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNAコピー数 (980 copies) で換算。

細胞数 (min:コピー数150) :

回収率を考慮したコピー数を *Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNAコピー数 (150 copies) で換算。

Sta.8-表層水

	2017.07	2017.10	2018.01	2018.04	平均	最小値	最大値
コピー数 (copies/250ml)	160.1	233.6	269.5	460.5	280.9	160.1	460.5
回収率 (%)	19.9	8.3	22.7	19.0	17.5	8.3	22.7
実際のコピー数 (copies/L)	322,655.7	1,132,297.5	507,647.4	967,375.6	732,494.1	322,655.7	1,132,297.5
細胞数 (min:コピー数980) (cells/L)	329.2	1,155.4	518.0	987.1	747.4	329.2	1,155.4
細胞数 (max:コピー数150) (cells/L)	2,151.0	7,548.7	3,384.3	6,449.2	4,883.3	2,151.0	7,548.7
細胞数 (平均) (cells/L)	1,240.1	4,352.0	2,009.4	3,829.2	2,857.7	1,240.1	4,352.0

Sta.8-底層水

	2017.07	2017.10	2018.01	2018.04	平均	最小値	最大値
コピー数 (copies/250ml)	354.6	22.1	199.4	198.2	193.6	22.1	354.6
回収率 (%)	23.1	11.4	19.1	25.7	19.8	11.4	25.7
実際のコピー数 (copies/L)	613,600.2	77,586.1	417,078.0	308,524.7	354,197.3	77,586.1	613,600.2
細胞数 (min:コピー数980) (cells/L)	626.1	79.2	425.6	314.8	361.4	79.2	626.1
細胞数 (max:コピー数150) (cells/L)	4,090.7	517.2	2,780.5	2,056.8	2,361.3	517.2	4,090.7
細胞数 (平均) (cells/L)	2,358.4	298.2	1,603.1	1,185.8	1,361.4	298.2	2,358.4

表4-7.大阪湾の2017年5月から2018年4月までの*Aplanochytrium* の細胞密度 (続き)

コピー数 (copies/250ml) : 定量PCRの実測値

DNA回収率 (%) : 算出されたDNA回収率

実際のコピー数 (1000ml) : コピー数 (250ml) をDNA回収率で除した。

細胞数 (min:コピー数980) :

回収率を考慮したコピー数を*Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNAコピー数 (980 copies) で換算。

細胞数 (min:コピー数150) :

回収率を考慮したコピー数を*Aplanochytrium* の1細胞あたりの18S rDNAコピー数 (150 copies) で換算。

#### Sta.15-表層水

	2017.07	2017.10	2018.01	2018.04	平均	最小値	最大値
コピー数 (copies/250ml)	438.9	3,488.3	130.0	374.8	1,108.0	130.0	3,488.3
回収率 (%)	12.7	9.3	21.1	28.1	17.8	9.3	28.1
実際のコピー数 (copies/L)	1,385,582.3	15,048,754.0	245,973.4	534,329.3	4,303,659.8	245,973.4	15,048,754.0
細胞数 (min:コピー数980) (cells/L)	1,413.9	15,355.9	251.0	545.2	4,391.5	251.0	15,355.9
細胞数 (max:コピー数150) (cells/L)	9,237.2	100,325.0	1,639.8	3,562.2	28,691.1	1,639.8	100,325.0
細胞数 (平均) (cells/L)	5,325.5	57,840.4	945.4	2,053.7	16,541.3	945.4	57,840.4

#### Sta.15-底層水

	2017.07	2017.10	2018.01	2018.04	平均	最小値	最大値
コピー数 (copies/250ml)	752.6	1,443.9	463.5	212.7	718.2	212.7	1,443.9
回収率 (%)	9.1	11.3	23.1	22.2	16.4	9.1	23.1
実際のコピー数 (copies/L)	3,318,847.7	5,120,622.8	800,964.0	383,687.8	2,406,030.6	383,687.8	5,120,622.8
細胞数 (min:コピー数980) (cells/L)	3,386.6	5,225.1	817.3	391.5	2,455.1	391.5	5,225.1
細胞数 (max:コピー数150) (cells/L)	22,125.7	34,137.5	5,339.8	2,557.9	16,040.2	2,557.9	34,137.5
細胞数 (平均) (cells/L)	12,756.1	19,681.3	3,078.5	1,474.7	9,247.7	1,474.7	19,681.3

## 第5章

### 次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析

## 1.材料と方法

### 1.1.TARA OCEANS のデータ解析

海洋生態系の多様性と機能を明らかにすることを目的とし、世界 40 カ国の科学者らによって編成されたチーム（TARA 海洋探査国際コンソーシアム）によって、2009 年から 3 年以上にわたって全球規模の探査航海が行われた（Pesant et al. 2015, de Vargas et al. 2015）。ウイルスからバクテリア、原生生物、植物プランクトン、動物プランクトンまで、全ての大きさのプランクトンを採取し遺伝情報が解析された。

採取されたプランクトンサンプルは、2つの水深（表層 [surface : SUR] とクロロフィル最大層 [deep chlorophyll maximum : DCM] ）、5つのフィルターサイズ（ $<5 \mu\text{m}$  もしくは  $<3 \mu\text{m}$ ,  $5\sim 20 \mu\text{m}$  もしくは  $3\sim 20 \mu\text{m}$ ,  $<20 \mu\text{m}$ ,  $20\sim 180 \mu\text{m}$ ,  $180\sim 2,000 \mu\text{m}$ ）に分けられ、解析された（Pesant et al. 2015）。

本研究では、47 のサンプリング地点から採取されたプランクトンサンプルから検出されたおよそ  $7.66 \times 10^9$  (7,660,000,000) の rDNA 配列を使用した。

最初に、TARA OCEANS のデータベース上でラビリンチュラ類として分類されている全 351 の OTUs [operational taxonomic units] を、2つの方法でラビリンチュラ類であることを確認した。

1つ目の方法は、ラビリンチュラ類とストラメノパイル生物群の 18S rRNA 遺伝子配列のアラインメントファイルに基づいて分子系統解析である。全 351 OTUs をラビリンチュラ類とストラメノパイル生物群の 18S rRNA 遺伝子配列のアラインメントファイル（Ueda et al. 2015, Honda et al. 1999）に基づき、ClustalX 2.1（Larkin et al. 2007 ; <http://www.clustal.org/clustal2/>）で profile alignment を行った。系統樹は Tamura-Nei model（Tamura and Nei 1993）で距離計算を行い、近隣結合法 [neighbor-joining : NJ]（Saitou and Nei 1987）で MEGA 5.2.2（Tamura et al. 2011 ; <http://www.megasoftware.net/>）を用いて系統樹を作成した。ギャップの処理は pairwise deletion を用いた。ブートストラップ値は 100 回の再抽出を行った。

2つ目の方法では、351 OTUs を Pan et al. (2017) の分類群に基づいて分類を行った。Pan et al. (2017) は、米国生物工学情報センターが提供している塩基配列データベースである Gen Bank において、ラビリンチュラ類として分類されている小サブユニットリボソーム RNA [small subunit ribosomal ribonucleic acid : SSU rDNA] の系統解析を行い、環境 DNA のみで構成されたクレードを含む多様な分類群が存在することが明らかにした。さらに、

GenBank に登録されているラビリンチュラ類のアクセッション番号と Pan et al. (2017) における分類群の対応表を公開している。一方、TARA OCEANS のデータベース上では、ラビリンチュラ類の全 351 OTUs を含むすべての OTUs に、アクセッション番号が割り当てられている。アクセッション番号とは、米国生物工学情報センターによって塩基配列データに割り当てられている固有の ID である。本研究では、TARA OCEANS のデータベース上でラビリンチュラ類として分類された全 351 OTUs に割り当てられているアクセッション番号を Pan et al. (2017) の対応表に照合し、分類を行った。

#### 1.1.1. ヤブレッツボカビ類の構成系統群の解析

ラビリンチュラ類の構成系統群を把握するために、表層、クロロフィル最大層、さらに、表層とクロロフィル最大層を併せた場合で、それぞれの系統群が占める割合を算出した。Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいた分類では、4 つの系統群（狭義のヤブレッツボカビ類、アブラノキトリウム類、オブロンギキトリウム類、狭義のラビリンチュラ類）に分類した。Pan et al. (2017) に基づいた分類では、25 の系統群に分類された。

また、表層、クロロフィル最大層、表層とクロロフィル最大層を併せた場合における、珪藻に対するラビリンチュラ類の割合、全生物に対するラビリンチュラ類の割合を算出した。統計学的分析は Microsoft Excel software を使用し、スチューデントの t-検定を行った。

#### 1.1.2. 環境中における *Aplanochytrium* 系統群による集合体形成

*Aplanochytrium* 系統群が環境中で、コロニーや植物プランクトンとの集合体を形成している可能性を調査した。*Aplanochytrium* 系統群のリード数が上位 30 位のサンプリング地点を対象とし、表層とクロロフィル最大層のデータをまとめた。次に、それぞれのデータを、5 つのフィルターサイズで分けられたサンプルを  $<20 \mu\text{m}$  ( $<5 \mu\text{m}$  もしくは  $<3 \mu\text{m}$ ,  $5\sim 20 \mu\text{m}$  もしくは  $3\sim 20 \mu\text{m}$ ,  $<20 \mu\text{m}$ ),  $20\sim 80 \mu\text{m}$ ,  $180\sim 2,000 \mu\text{m}$  の 3 つのサイズ画分分類した。最後に、それぞれのサイズ画分が寄与する割合を算出した。統計学的分析は Microsoft Excel software を使用し、スチューデントの t-検定を行った。

### 1.1.3. *Aplanochytrium* 系統群と植物プランクトン、動物プランクトンのリード数の相関

*Aplanochytrium* 系統群のリード数が多いサンプリング地点の上位 30 位を対象とし、*Aplanochytrium* 系統群と、光合成生物（渦鞭毛藻類を除く）、珪藻、緑藻、カイアシ類との相関分析を行った。統計分析フリーソフト R version 3.3.3 (R Core Team 2012; <http://www.R-project.org/>) を使用し統計学的分析を行い、ピアソンの積率相関 [Pearson's product moment correlation coefficient] を算出した。

## 1.2. 次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析

### 1.2.1. 野外サンプリング

#### 1.2.1.1. 調査場所と調査期間

第4章の定量 PCR による *Aplanochytrium* 系統群の現存量調査と同じく、大阪湾でのサンプリングは、2016年3月から2018年1月のおよそ2年間、大阪府立環境農林水産総合研究所の調査船「おおさか」に乗船させていただき調査を行った。2018年2月からは、同研究所からサンプルを送付いただいた。

前述したように、大阪湾における、ヤブレッツボカビ類の細胞密度と構成系統群に関する継続的な調査が行われており、分離株の分子系統解析から、10の未同定または新規の系統群を含む27系統群が存在することが明らかとなった (Ueda et al. 2015)。沿岸域の主要系統群は、*Aplanochytrium* sp. が夏から秋にかけて、unidentified thraustochytrid 3b が春と秋から冬に出現した。このことからヤブレッツボカビ類は系統群ごとに、水温、塩分、栄養源などの環境要因によって棲み分けをしており、季節によって出現する系統群が移り変わる可能性が示唆された。

#### 1.2.1.2. 野外サンプルの準備

採取した海水 500 ml をメンブレンフィルター（孔径 0.8  $\mu$ m; Merck Millipore）でろ過し、4分割した。分割した一片を 1.5 ml マイクロチューブに回収し、サブサンプルとした。サブサンプルは、DNA 抽出まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。

## 1.2.2.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み

### 1.2.2.1.ライブラリーの調整

2段階 PCR によってライブラリーを調整した (図 5-1)。まず、標的とする領域に特異的な配列と MiSeq (illumina) での解析に必要な配列 (アダプター配列) を含むプライマーを用いた 1st PCR を行った。次に、得られたアンプリコンを精製し、アダプター配列とサンプル識別を行うためのインデックス配列を含むプライマーを用いて 2nd PCR を行った。得られたアンプリコンを精製し、次世代シーケンサー解析を行った。

環境 DNA の網羅的な解析である次世代シーケンサーの解析結果は、DNA を抽出し、PCR 増幅してアンプリコンを生成する作業に依存すると考えられている (Stoeck et al. 2010)。そこで、1st PCR で使用する 1st PCR プライマー、次世代シーケンサーに適した DNA 抽出法、さらに、1st PCR および 2nd PCR で使用する PCR 酵素を検討した。

#### 1.2.2.1.1. 1stPCR プライマーの検討

次世代シーケンサー解析では、系統的に多様で広い範囲の生物群を検出できるように、小サブユニットリボソーム RNA の高頻度可変領域 [hypervariable region : HVR] を標的としたプライマーが使用されることが多い。一般的に使用される領域として、原核生物では 16S rDNA の V3 領域と V6 領域 (Huse et al. 2008)、真菌では内部転写領域 [internal transcribed spacer : ITS] (Vobis et al. 2004)、真核生物では 18S rDNA の V4 領域と V9 領域 (例えば、Amaral-Zettler et al. 2009, Stoeck et al. 2010) が挙げられる。そこで、本研究では、V4 領域と V9 領域を標的とした 1st PCR プライマーでライブラリーを調整し、次世代シーケンサー解析に適した 1st PCR プライマーを検討した。

使用した PCR プライマーセットを表 5-1 に示す。TAReuk454FWD1 と TAReukREV3 は V4-V5 領域 (Stoeck et al. 2010) を、SSU-F1 と SSU-R1772 は V7-V9 領域 (Tanabe et al. 2015) を標的とするように設計されている。V4-V5 領域を標的とする TAReuk454FWD1 と TAReukREV3 は、ラビリンチュラ類との相補性がより高くなるように改変を行った。さらに、V4-V5 領域と V7-V9 領域を標的とした PCR プライマーセットとラビリンチュラ類に特異的なプライマーセットである LABY-A と LABY-Y のプライマーセット (Stokes et al. 2002 ; 表 5-1) の比較を行った。

#### 1.2.2.1.2.DNA 抽出法の検討

本研究では、野外に生息する *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を定量するために、定量 PCR を行った。その過程で、野外サンプルに適した DNA 抽出する方法に関する検討を行った（第4章 参照）。その結果、比較した抽出法の中では、DNeasy PowerSoil Kit が最も検出感度が高いことが明らかになった。一方、次世代シーケンサー解析でプランクトンの群集構造解析を行った研究の多くで、キレート樹脂である Chelex 100 Chelating Resin (Bio-Rad) を使用して DNA 抽出が行われている (Tanabe et al. 2015, Nagai et al. 2016, 2017)。そこで、本研究では、DNeasy PowerSoil Kit と Chelex 100 Chelating Resin で抽出した DNA を使用して次世代シーケンサー解析を行い、適した DNA 抽出法を検討した。

DNeasy PowerSoil Kit を使用して、これまでと同様の方法で DNA 抽出を行った（第4章 参照）。最初にサブサンプルをホモジナイザーベッスル (BIO-BIK) で 1 分間ホモジナイズし、ホモジナイズ後は、製品に添付されている使用法の指示に従って使用した。

Chelex 100 Chelating Resin は、最終濃度が 5% (w/v) になるようにイオン交換水で溶解した懸濁液を使用した (Tanabe et al. 2015, Nagai et al. 2016, 2017)。100  $\mu$ l の 5% Chelex 100 Chelating Resin をサブサンプルに添加し、ホモジナイザーベッスルで 1 分間ホモジナイズし、97°C で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、抽出された DNA を回収した。

#### 1.2.2.1.3.PCR 酵素の検討

これまでに、ラビリンチュラ類の新規系統群を探索することを目的とし、野外から採取した紅藻 (*Ceramium* sp.) から抽出した DNA を PCR で増幅し、次世代シーケンサー解析でラビリンチュラ類の群集構造解析が行われた (2016 年度 甲南大学大学院 博士後期課程修了 土井 耕作氏 博士学位論文)。この研究では、PCR 酵素として KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) (日本ジェネティクス株式会社) が使用された。一方、プランクトンの群集構造解析や食性解析などを行った研究の多くでは、PCR 酵素として KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO) が使用された。(Dzhembekova et al. 2017, Hirai et al. 2015, Tanabe et al. 2015, Nagai et al. 2016, Nagai et al. 2017, Hirai and Nagai 2017a, 2017b, 2017c)。そこで、本研究では、KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) と KOD -Plus- Ver.2 でライブラリーを調整して次世代シーケンサー解析を行い、適した PCR 酵素を検討した。

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) は、1.0  $\mu$ l の DNA 鋳型、0.75  $\mu$ l のプライマーセ

ット (10 pmol/ $\mu$ l) , 12.5  $\mu$ l の 2 $\times$ KAPA HiFi HotStart ReadyMix の組成で反応液を調整した。PCR は、 95 $^{\circ}$ Cで 5 分間を 1 サイクル, 95 $^{\circ}$ Cで 30 秒, 56 $^{\circ}$ Cで 30 秒, 72 $^{\circ}$ Cで 1 分の 3 ステップを 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ Cで 7 分を 1 サイクルの条件で行った。

KOD-Plus- Ver.2 は、 0.5  $\mu$ l の DNA 鋳型, 0.75  $\mu$ l のプライマーセット (10 pmol/ $\mu$ l) , 2.5  $\mu$ l の 10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus-, 2.5  $\mu$ l の dNTP Mixture (各 2.0 mM) , 1.0  $\mu$ l の 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5  $\mu$ l の KOD-Plus- (1 U/ $\mu$ l) の組成で反応液を調整した。PCR は、 94 $^{\circ}$ Cで 2 分間を 1 サイクル, 94 $^{\circ}$ Cで 15 秒, 50 $^{\circ}$ C (V4-V5 領域) 56 $^{\circ}$ C (V7-V9 領域およびラビリンチュラ類特異的領域) で 30 秒, 68 $^{\circ}$ Cで 40 秒の 3 ステップを 30 サイクルの条件で行った。

いずれの場合も、PCR 装置は、Veriti Thermal Cycler を使用した。アガロースゲル電気泳動によって、アンプリコンを確認した。SYBR™ Safe DNA Gel Stain in 0.5X TBE と Agarose L03 「TAKARA」を含む 2%アガロースゲルを作製した。アガロースゲル電気泳動によって、DNA の増幅を確認した。

#### 1.2.2.1.4.アンプリコンの精製

増幅されたアンプリコンを Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) で精製した。

まず、アンプリコン 1  $\mu$ l あたり AMPure XP を 1.8  $\mu$ l を加えた。ピペティングで混合、5 分間静置し、DNA 断片を AMPure XP に結合させた。マグナススタンド (日本ジェネティクス株式会社) 上で 2 分間静置した後、上清を除去した。次に、マグナススタンド上で 70%エタノール 200  $\mu$ l を加え、30 秒静置後に上清を除去した。70%エタノール洗浄は 2 回繰り返した。マグナススタンドからおろし、RNase-free Water を 25  $\mu$ L を加え、ピペティングを行い再懸濁した。5 分間静置後、マグナススタンド上で 1 分間静置した。マグナススタンド上で精製された DNA を含む上清を新しい PCR チューブに移した。精製した DNA は、Qubit 3.0 Fluorometer を用いて濃度測定した。

#### 1.2.2.1.5.2nd PCR とアンプリコンの精製

精製した 2nd PCR のアンプリコンを株式会社 生物技研に送付し、2nd PCR, アンプリコンの精製をしていただいた。

2nd PCR は、TAKARA Ex Taq を PCR 酵素として使用した。2.0  $\mu$ l の DNA 鋳型, 0.5  $\mu$ l

のプライマーセット (10 pmol/ $\mu$ l) , 0.1  $\mu$ l の TAKARA Ex Taq (5 U/ $\mu$ l) , 1.0  $\mu$ l の 10 × Ex Taq Buffer (20 mM Mg<sup>2+</sup> plus) , 0.8  $\mu$ l の dNTP Mixture (各 2.5 mM) の組成で反応液を調整した。PCR は, 94°C で 2 分間を 1 サイクル, 94°C で 30 秒, 60°C で 30 秒, 72°C で 30 秒の 3 ステップを 10 サイクル, 72°C で 5 分を 1 サイクルの条件で行った。2nd PCR で得られたアンプリコンの精製は, Agencourt AMPure XP で精製した。

#### 1.2.2.2.MiSeq によるシーケンシング

株式会社 生物技研に MiSeq によりシーケンシングいただいた。

全自動キャピラリー電気泳動システム Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて, 作製したライブラリーの品質確認が行われた。品質確認で合格したライブラリーを, MiSeq を用いて 2×300 bp ペアエンド解析を行った。

#### 1.2.2.3.データ解析

データ解析は, 株式会社 生物技研に依頼した。

##### ①リードのクオリティーフィルタリング

Fastx toolkit (Pearson et al. 1997 ; [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) の fastq\_barcode\_splitter を用いて, 配列の読みはじめが使用したプライマーと完全一致する配列のみを抽出した。その後, sickle (Joshi and Fass 2011 ; [https://github.com/najoshi/sickle.](https://github.com/najoshi/sickle)) を用いてクオリティー値が 20 未満の配列を除き, 40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。

##### ②リードのマージ

ペアエンドリード間のオーバーラップを検出し, マージする (つなぎ合わせる) ソフトウェアツールである FLASH [Fast Length Adjustment of SHort reads] (Magoč and Salzberg 2011 ; [http://www.cbcb.umd.edu/software/flash.](http://www.cbcb.umd.edu/software/flash)) を用いて, ①クオリティーフィルタリングを通過した配列をマージした。マージ後の断片長 480 塩基, リードの断片長 270 塩基, 最低オーバーラップ長 10 塩基をマージの条件とした。

### ③キメラチェック

②リードのマージ でマージされた配列（結合配列）を、usearch (Edgar 2010 ; <https://www.drive5.com/usearch/download.html>)の uchime アルゴリズムと Silva(Quast et al. 2013 ; <https://www.arb-silva.de/>) を使用し、以下のようなキメラ配列のチェックを行った。まず、1本の結合配列を4等分に断片化した。断片化した結合配列をそれぞれ Silva の 97%OTU を比較した。4本の断片すべてが同一の Silva の OTU 配列として解析された結合配列は実在する配列と判断された。一方、1本以上が同一の Silva の OTU 配列として解析されなかった結合配列がPCRによる増幅ミスによって得られた実在しない配列、つまりキメラ配列と判断され、キメラ配列と判断された結合配列は破棄した。

### ④OTU 作成と系統推定

OTU 作成は Qiime (Caporaso et al. 2010 ; <http://qiime.org/>) のワークフロースクリプトを用いて、リファレンスなし、パラメーターをすべてデフォルトの条件で行った。③キメラチェックを通過した結合配列を97%以上の相同性の条件で、それぞれ OTU としてまとめ、分類群の同定に使用した。Silva の 97%の OTU 配列を使用して、作成された OTU の代表配列と相同性検索を行った。同時に、作成された OTU の代表配列と NCBI の塩基配列を BLAST 相同検索により比較し、系統推定を行った。

#### 1.2.2.4.群集構造解析

得られたデータ上で真核生物として分類されている全ての OTUs を 8 大系統群に基づいて分類した (Baldauf 2003)。

また、得られたデータ上でラビリンチュラ類として分類されている全ての OTUs を、2つの方法でラビリンチュラ類であることを確認した。1つ目の方法は、ラビリンチュラ類とストラメノパイル生物群の 18S rRNA 遺伝子配列のアラインメントファイルに基づく分子系統解析、2つ目の方法は、Pan et al. (2017) の分類群に基づく分類である。詳細は「1.1.TARA OCEANS のデータ解析」を参照。

### 1.2.3.大阪湾のプランクトンの群集構造解析

#### 1.2.3.1.ライブラリーの作製

1st PCR のプライマーは、V4-V5 領域を標的とした TAREuk454FWD1 と TAREukREV3 (Stoeck et al. 2010) , DNA 抽出法は DNeasy PowerSoil Kit, PCR 酵素は KOD -Plus- Ver.2 が適していると判断した (「1.2.2.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み」参照)。また, 2nd PCR でも PCR 酵素として KOD -Plus- Ver.2 を使用した。

#### 1.2.3.2.MiSeq によるシーケンシング

株式会社生物技研に MiSeq によりシーケンシングを依頼した。

全自動キャピラリー電気泳動システム Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit を用いて, 作製したライブラリーの品質確認が行われた。MiSeq を用いて 2×300 bp ペアエンド解析で行われた。

#### 1.2.3.3.データ解析

国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所 グループ長 長井 敏 博士にデータを解析いただいた。

##### ①リードのクオリティーフィルタリング

Trimmomatic version 0.35 (Bolger et al. 2014 ; <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) を用いてリードのクオリティーフィルタリングを行った。3'末端の 25bp のサイズの window でのクオリティーが 30 より低い塩基から端を削除した。また, 両端からクオリティーチェックを行い, クオリティーが 20 より低い塩基から端を削除した。

##### ②リードのマージ

ペアエンドリード間のオーバーラップを検出し, マージするソフトウェアツールである Usearch version 8.0.1517 (<http://www.drive5.com/usearch/>) を用いて, ①クオリティー

フィルタリングを通った配列をマージした。

### ③キメラチェック

誤った配列やキメラ配列は、Mothur の pre.cluster (diffs = 4) コマンド, chimera.uchime コマンド (minh=0.1) を使用して検出・除去した (Edgar et al., 2011 ; [http://drive5.com/usearch/manual/uchime\\_algo.html](http://drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html)) 。

### ④OTU 作成と系統推定

Mothur の unique.seqs コマンドを使用して、同一の配列を OTU にまとめた。得られた配列を count.seqs コマンドによって OTU としてカウントし、その後の分類学的同定に使用した。

#### 1.2.3.4.群集構造解析

得られたデータ上でラビリンチュラ類として分類されている全 138 の OTUs を、2つの方法でラビリンチュラ類であることを確認した。1つ目の方法は、ラビリンチュラ類とストラメノパイル生物群の 18S rRNA 遺伝子配列のアラインメントファイルに基づく分子系統解析、2つ目の方法は、Pan et al. (2017) の分類群に基づく分類である。方法は「1.1.TARA OCEANS のデータ解析」を参照。

## 2.結果

### 2.1.TARA OCEANS のデータ解析

TARA OCEANS のデータベース上では、351 OTUs がラビリンチュラ類として分類されている。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいた分類では、326 OTUs がラビリンチュラ類、21 OTUs が外群として同定され、4つの分類群に分類された。残りの4 OTUs はラビリンチュラ類ではあるものの、以下の4つの分類群に分類することはできなかった。ラビリンチュラ類として同定された326 OTUsのうち、127 OTUs が狭義のヤブレツボカビ類、60 OTUs がオブロンギキトリウム類、45 OTUs がアプラノキトリウム類、94 OTUs が狭義のラビリンチュラ類であった(表 5-2a)。

Pan et al. (2017) に基づいた分類では、351 OTUs のすべてがラビリンチュラ類として同定され、26 の分類群に分類された(表 5-2b)。OTU が多かった分類群は、Labyrinthulida ANT10\_3 が 61 OTUs、*Aplanochytrium* と *Oblongichytrium* が 43 OTUs、LAB7 が 35 OTUs、*Labyrinthula* が 30 OTUs であった。

#### 2.1.1.ヤブレツボカビ類の構成系統群の組成

ラビリンチュラ類の構成系統群を把握するために、本研究では、表層、クロロフィル最大層、さらに、表層とクロロフィル最大層を併せた場合で、それぞれの系統群が占める割合を算出した。全ラビリンチュラ類のリード数に対する、それぞれの系統群のリード数の割合を算出した。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいた分類では、3つの系統群(オブロンギキトリウム類、アプラノキトリウム類、狭義のラビリンチュラ類)が全ラビリンチュラ類のリード数のうち、平均80~90%を占めた。表層では、アプラノキトリウム類が23.7% (4.5%~72.5%)、オブロンギキトリウム類が29.0% (2.3%~65.4%)、狭義のラビリンチュラ類が32.6% (3.8%~84.0%)を占めた(図 5-3 Aa)。クロロフィル最大層では、アプラノキトリウム類が25.0% (4.0%~56.3%)、オブロンギキトリウム類が24.7% (5.2%~51.1%)、狭義のラビリンチュラ類29.4% (0.0~60.9%)を占めた(図 5-3 Ba)。表層とクロロフィル最大層を併せた場合では、アプラノキトリウム類が23.2% (4.6%~53.4%)、オブロンギキトリウム類が27.9% (5.8%~65.4%)、狭義のラビリンチュラ類が32.8% (8.3%~84.0%)を占めた(図 5-3 Ca)。

Pan et al. (2017) に基づいた分類では, *Aplanochytrium*, Labyrinthulida ANT10\_3, LAB7 が全ラビリンチュラ類のリード数のうち, 大部分を占めた。表層では, *Aplanochytrium* が 23.1% (0.2%~72.6%), Labyrinthulida ANT10\_3 が 13.4% (1.3%~83.8%), LAB7 が 36.2% (2.6%~75.4%) を占めた (図 5-3 Ab)。

クロロフィル最大層では, *Aplanochytrium* が 19.3% (1.4%~52.9%), Labyrinthulida ANT10\_3 が 16.7% (2.5%~53.7%), LAB7 が 25.2% (0.0%~62.1%), さらに, LAB15 が 22.0% (0.0%~73.9%) を占めた (図 5-3 Bb)。表層とクロロフィル最大層を併せた場合では, *Aplanochytrium* が 20.1% (0.2%~52.2%), Labyrinthulida ANT10\_3 が 15.3% (1.3%~83.8%), LAB7 が 31.6% (1.8%~75.4%), さらに, LAB15 が 12.6% (0.0%~57.8%) を占めた (図 5-3 Cb)。

また, 表層水, クロロフィル最大層, 表層とクロロフィル最大層を併せた場合について, 珪藻に対するラビリンチュラ類の割合をそれぞれ算出した。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいて分類した場合, それぞれのサンプリング地点における珪藻に対するラビリンチュラ類の割合はいずれの水深でもおよそ 10%程度であり, 表層では 11.5% (0.0%~58.2%), クロロフィル最大層では 9.1% (0.0%~32.1%), 表層とクロロフィル最大層を併せた場合では 10.1% (0.0%~58.2%) であった (図 5-4 Aa, Ba, Ca)。

Pan et al. (2017) に基づいて分類した場合, それぞれのサンプリング地点における珪藻に対するラビリンチュラ類の割合はいずれの水深でもおよそ 10%程度であり, 表層では 12.4% (0.0%~58.8%), クロロフィル最大層では 13.9% (0.0%~56.0%), 表層とクロロフィル最大層を併せた場合では 12.0% (0.0%~58.3%) であった (図 5-4 Ab, Bb, Cb)。

さらに, 表層水, クロロフィル最大層, 表層とクロロフィル最大層を併せた場合について, 全生物に対するラビリンチュラ類の割合をそれぞれ算出した。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいて分類した場合, それぞれのサンプリング地点における全生物に対するラビリンチュラ類の割合はいずれの水深でも 0.05%程度であり, 表層では 0.05% (0.00%~0.14%), クロロフィル最大層では 0.05% (0.00%~0.19%), 表層とクロロフィル最大層を併せた場合では 0.05% (0.00%~0.11%) であった (図 5-5 Aa, Ba, Ca)。

Pan et al. (2017) に基づいて分類した場合, それぞれのサンプリング地点における全生物に対するラビリンチュラ類の割合はいずれの水深でも 0.05%程度であり, 表層では 0.05% (0.00%~0.14%), クロロフィル最大層では 0.08% (0.00%~0.29%), 表層とクロロフ

イル最大層を併せた場合では 0.06% (0.00%~0.13%) であった (図 5-5 Ab, Bb, Cb)。

### 2.1.2. *Aplanochytrium* 系統群の集合体形成

*Aplanochytrium* が環境中で集合体を形成している可能性を検討するため、 $<20 \mu\text{m}$ ,  $20\sim 80 \mu\text{m}$ ,  $180\sim 2,000 \mu\text{m}$  の 3 つのサイズの画分に分けて、それぞれのサイズ画分が寄与する割合を算出した。全 47 のサンプリング地点のうち 5 つのサンプリング地点は、一部のサイズの画分のサンプルのデータが存在しないため、42 のサンプリング地点を対象としている。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいて分類した場合、 $<20 \mu\text{m}$ ,  $20\sim 180 \mu\text{m}$ ,  $180\sim 2,000 \mu\text{m}$  のサイズ画分がそれぞれ 80.2%, 16.5%, 3.3% ずつ寄与した (図 5-7 a)。サンプリング地点 42 地点のうち 18 地点 (42.9%) では、検出された *Aplanochytrium* 系統群のうち  $>20 \mu\text{m}$  のサイズ画分から検出された割合が 25%, 3 地点 (7.1%) では 50% を超えた。

Pan et al. (2017) に基づいて分類した場合、*Aplanochytrium* は  $<20 \mu\text{m}$ ,  $20\sim 180 \mu\text{m}$ ,  $180\sim 2,000 \mu\text{m}$  のサイズ画分でそれぞれ 79.6%, 16.1%, 4.4% を占めた (図 5-7 b)。サンプリング地点 42 地点のうち 16 地点 (38.1%) では、検出された *Aplanochytrium* のうち  $>20 \mu\text{m}$  のサイズ画分から検出された割合が 25%, 3 地点 (7.1%) では 50% を超えた。

### 2.1.3. *Aplanochytrium* 系統群と植物プランクトン、動物プランクトンのリード数の相関

*Aplanochytrium* と捕食-被食の関係にある生物との相関を把握するために、本研究では、*Aplanochytrium* 系統群のリード数が豊富なサンプリング地点上位 30 位を対象とし、*Aplanochytrium* 系統群のリード数と、光合成生物 (渦鞭毛藻類を除く)、珪藻、緑藻、カイアシ類のそれぞれのリード数との相関分析を行った (図 5-8)。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいて分類した場合、*Aplanochytrium* 系統群と光合成生物、*Aplanochytrium* 系統群と緑藻は、それぞれ正の相関があった (*Aplanochytrium* 系統群と光合成生物 :  $r=0.388$ ,  $p=0.034$ , *Aplanochytrium* 系統群と緑藻 :  $r=0.535$ ,  $p=0.002$ )。一方、*Aplanochytrium* 系統群と珪藻、*Aplanochytrium* 系統群とカイアシ類は、それぞれ相関がなかった (*Aplanochytrium* 系統群と珪藻 :  $r=0.323$ ,  $p=0.081$ , *Aplanochytrium* 系統群と光合成生物 :  $r=0.123$ ,  $p=0.517$ )。

Pan et al. (2017) に基づいて分類した場合も、*Aplanochytrium* 系統群と光合成生物、

*Aplanochytrium* 系統群と緑藻は、それぞれ正の相関があった (*Aplanochytrium* 系統群と光合成生物 :  $r=0.401$ ,  $p=0.028$ , *Aplanochytrium* 系統群と緑藻 :  $r=0.552$ ,  $p=0.002$ ,)。一方, *Aplanochytrium* 系統群と珪藻, *Aplanochytrium* 系統群とカイアシ類は, それぞれ相関がなかった (*Aplanochytrium* 系統群と珪藻 :  $r=0.341$ ,  $p=0.065$ , *Aplanochytrium* 系統群とカイアシ類 :  $r=0.160$ ,  $p=0.399$ )。

## 2.2.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み

### 2.2.1.本研究で使用するプライマーの検討

18S rDNA の V4-V5 領域と V7-V9 領域を標的とした 1st PCR プライマーでライブラリーを調整し, 次世代シーケンサー解析に適した PCR プライマーを検討した。

V4-V5 領域を標的とする TAREuk454FWD1 と TAREukREV3 (Stoeck et al. 2010) のプライマーセットの方が, 検出されるリード数が多かった (図 5-9 Aa)。しかし, V7-V9 領域を標的とする SSU-F1 と SSU-R1772 のプライマーセットは (Tanabe et al. 2015) の方が, ケルコゾア生物群, リザリア生物群ストラメノパイル生物群を含む, より多様な生物群が検出された (図 5-9 Aa)。ケルコゾア生物群, リザリア生物群には, クロララクニオンや放散虫, 有孔虫が含まれ (Baldauf 2003), 大阪湾で採取したネットサンプルから *Acantho-metron* や *Sticholonche* を観察している。また, ストラメノパイル生物群生物群には, 不等毛植物 (珪藻, 褐藻, 黄金色藻など) に加えて卵菌, サカゲツボカビ, ラビリンチュラ類, オパリーナ類, ビコソエカ類などが含まれ (Baldauf 2003), 大阪湾で採取したネットサンプルから *Coscinodiscus*, *Eucampia*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* を観察している。このことから, V7-V9 領域を標的とするプライマーセットの方が, 次世代シーケンサー解析の PCR プライマーに適していると考えられた。

さらに, V4-V5 領域と V7-V9 領域を標的とした PCR プライマーセットとラビリンチュラ類に特異的なプライマーセットである LABY-A と LABY-Y のプライマーセット (Stokes et al. 2002) の比較を行った (図 5-9 Ba)。その結果, ラビリンチュラ類の構成系統群に大きな差はみられなかった。

### 2.2.2.次世代シーケンサー解析に適した DNA 抽出法

DNeasy PowerSoil Kit と Chelex 100 Chelating Resin で抽出した DNA を使用して, 次世代シーケンサー解析に適した DNA 抽出法を検討した。

Chelex 100 Chelating Resin よりも DNeasy Power Soil Kit の方が、検出されるリード数が多かった (図 5-9 Ab)。

また、DNeasy PowerSoil Kit と Chelex 100 Chelating Resin では、検出される生物群が大きく異なり、DNeasy Power Soil Kit で DNA 抽出した場合、リザリアやストラメノパイル、ケルコゾアを含むより多様な生物群が検出された (図 5-9 Ab)。前述したように、ケルコゾア生物群、リザリア生物群に含まれる放散虫やストラメノパイル生物群生物群に含まれる珪藻を観察している。このことから、DNeasy Power Soil Kit の方が、より野外サンプルからの DNA 抽出に適していると考えられた。

検出されるリード数の多さと生物群の多様性から、次世代シーケンサー解析に適した DNA 抽出法は、DNeasy Power Soil Kit と判断した。

### 2.2.3.次世代シーケンサー解析に適した PCR 酵素

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) と KOD -Plus- Ver.2 でライブラリーを調整し、次世代シーケンサー解析に適した PCR 酵素を検討した。KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) と KOD -Plus- Ver.2 では、場合によって検出されるリード数に差があった (図 5-9 Aa, Ab)。一方、検出される生物群はほとんど同じであった (図 5-9 Aa, Ab)。

次世代シーケンサー解析に適した PCR 酵素は、KOD -Plus- Ver.2 とした。

### 2.3.大阪湾に生息するラビリンチュラ類の群集構造解析

2016年3月から、大阪湾の湾央と湾奥においてサンプリング調査を行った。そのうち、2017年5月から2018年4月に採取した表層水と底層水から、次世代シーケンサー解析でプランクトンの群集構造解析を行った。

大阪湾全体では、多様なラビリンチュラ類が1年間を通して普遍的に生息していることが明らかになった。

本研究では、2つの方法でラビリンチュラ類を分類した。

Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいて分類した場合、ラビリンチュラ類として同定された138 OTUsのうち、狭義のヤブレッツボカビ類が84 OTUs、オブロンギキトリウム類が35 OTUs、アプラノキトリウム類が16 OTUsであった。

Pan et al. (2017) に基づいて分類した場合、大阪湾には19の分類群が生息していることが

明らかになった。OTUが多かった分類群は、170OTUsが検出された *Oblongichytrium*, 150OTUsが検出された *Aplanochytrium* である。新しい系統群も検出され、LAB2 と Thraustochytriidae SEK690 がそれぞれ 8 OTUs, LAB7 が 7 OTUs, LAB17 と LAB4 がそれぞれ 5 OTUs, LAB8 と LAB14 が 3 OTUs, Amphihilidae group, LAB5, LAB15, Thraustochytriidae が 2 OTUs, *Aurantiochytrium*, LAB1, LAB9, , LAB10, Labyrinthulida ANT10\_3, *Ulkenia* が 1 OTU 検出された。

また、Ueda et al. (2015) と Honda et al. (1999) に基づいた分類では、3つの系統群（オブロンギキトリウム類、アプラノキトリウム類、狭義のヤブレッツボカビ類）が全ラビリンチュラ類のリード数のうち、ほぼ 100%を占め、狭義のラビリンチュラ類は検出されなかった（図 5-10 a）。湾中央の表層では、アプラノキトリウム類が 53.0% (0.0%~100.0%)、オブロンギキトリウム類が 22.6% (0.0%~65.5%)、狭義のヤブレッツボカビ類が 24.3% (0.0%~100.0%) を占めた。湾中央の底層では、アプラノキトリウム類が 48.4% (4.0%~100.0%)、オブロンギキトリウム類が 40.7% (0.0%~96.0%)、狭義のヤブレッツボカビ類が 10.6% (0.0~30.8%) を占めた。湾奥の表層では、アプラノキトリウム類が 61.3% (0.0%~100.0%)、オブロンギキトリウム類が 10.6% (0.0%~71.0%)、狭義のヤブレッツボカビ類が 28.1% (0.0%~100.0%) を占めた。湾奥の底層では、アプラノキトリウム類が 32.7% (0.0%~72.2%)、オブロンギキトリウム類が 59.4% (0.0%~84.8%)、狭義のヤブレッツボカビ類が 7.8% (0.0~100.0%) を占めた。

Pan et al. (2017) に基づいた分類では、表層と底層で優占している系統群が異なった。表層では、*Aplanochytrium*, *Oblongichytrium*, *Ulkenia* が、一方の底層では、*Aplanochytrium*, LAB7, *Oblongichytrium* が全ラビリンチュラ類のリード数のうち、大部分を占めた(5-10 b)。湾中央の表層では、*Aplanochytrium* が 69.2% (0.0%~100.0%)、*Oblongichytrium* が 10.0% (0.0%~66.7%)、*Ulkenia* が 8.9% (0.0%~100.0%) を占めた。湾中央の底層では、*Aplanochytrium* が 59.2% (11.1%~100.0%)、LAB7 が 12.3% (0.0%~60.0%)、*Oblongichytrium* が 20.5% (0.0%~88.9%) を占めた。湾奥の表層では、*Aplanochytrium* が 65.7% (0.0%~100.0%)、*Oblongichytrium* が 10.3% (0.0%~71.0%)、*Ulkenia* が 9.4% (0.0%~100.0%) を占めた。湾奥の底層では、*Aplanochytrium* が 51.4% (0.0%~100.0%)、LAB7 が 20.1% (0.0%~100.0%)、*Oblongichytrium* が 15.8% (0.0%~90.9%) を占めた。

### 3.考察

#### 3.1.TARA OCEANS のデータ解析

##### 3.1.1.*Aplanochytrium* 系統群の集合体形成

これまでに、環境中でヤブレッツボカビ類の集合体が観察されている。1例目は、ハワイ沖におけるアクリフラビン直接計数法による調査であり、マリンスノーからヤブレッツボカビ類が検出された (Li et al. 2013)。2例目は、北大西洋におけるラビリンチュラ類特異的なプローブ (Lab-Y) を使用した CARD-FISH による調査であり、マリンスノーからヤブレッツボカビ類が検出された (Bochdansky et al. 2016)。本研究では、世界中の海洋を対象に行われた海洋プランクトンの群集構造解析である TARA OCEANS の解析を行った。その結果、世界中の海洋から採取したサンプルで、*Aplanochytrium* の栄養細胞以上の大きさのサイズ画分から *Aplanochytrium* が検出された (図 5-7)。これは、世界中の海洋で、*Aplanochytrium* がコロニーや植物プランクトンとの集合体を形成している可能性や、動物プランクトンに捕食されて消化管に残留している可能性を示している。

##### 3.1.2.*Aplanochytrium* 系統群と植物プランクトン、動物プランクトンのリード数の相関

世界中の海洋を対象に行われた海洋プランクトンの群集構造解析である TARA OCEANS の解析を行った結果、ほとんどすべてのサンプリング地点において、オブロンギキトリウム類、アプラノキトリウム類、狭義のラビリンチュラ類が主要な構成系統群であることが明らかになった (図 5-3)。また、珪藻に対するラビリンチュラ類の割合は、いずれの水深でも 10%程度であった (図 5-4)。系統群ごとに 1細胞あたりの 18S rDNA コピー数に差があり、同じ生物群でも属や種によって差がある (Prokopowich et al. 2003, Zhu et al. 2005, Godhe et al. 2008, Gong et al. 2013, Hariganeya et al. 2013)。そのため、18S rDNA コピー数をそのまま細胞数に換算することはできない。しかし、アプラノキトリウム類の 18S rDNA コピー数が、海洋の主要な一次生産者である珪藻 (Leblanc et al. 2012) の 10%に相当し、アプラノキトリウム類が、海洋生態系に大きな影響を与えていると考えられる。

また、アプラノキトリウム類のリード数は、緑藻と渦鞭毛藻類を除く光合成生物のリード数とわずかに正の相関があった (図 5-8)。緑藻である *Pyramimonas* (ブラシノ藻)、光合成生物である *Pleurochrysis* (ハプト藻) からも栄養を摂取している様子が観察されており (2018年

度 甲南大学 卒業研究生 茂木 大地氏 私信), 緑藻や光合成生物のリード数と正の相関があることは妥当な結果として理解できる。一方, *Aplanochytrium* は珪藻から栄養摂取できることが明らかになったが, 珪藻のリード数と正の相関はないという結果となった。

ハプト藻は海洋の主要な一次生産者であり, 重要な役割を果たしている (Andersen et al. 1996)。近年の人工衛星 (SeaWiFS) による大規模な海洋調査では, ハプト藻の年間現存量は, 珪藻の2倍に匹敵する  $2.5 \times 10^9$  kg Chla であると推定されている (Liu et al. 2009)。さらに, ハプト藻は珪藻が希薄な外洋にも分布していると報告されている (Liu et al. 2009)。*Aplanochytrium* が珪藻だけでなくハプト藻からも栄養摂取できることから, 沿岸域だけでなく, 珪藻が希薄な外洋でも生息できると推測される。

### 3.2.大阪湾に生息するプランクトンの群集構造解析

大阪湾においてヤブレッツボカビ類の細胞密度と構成系統群の継続的な調査が行われた (Ueda et al. 2015)。その結果, 季節によって出現するヤブレッツボカビ類の系統群が移り変わっており, 夏から秋にかけて *Aplanochytrium* sp. が, 春と秋から冬にかけて unidentified thraustochytrid 3b が, 不定期に *Oblongichytrium* sp. 2 が出現していることが明らかになった。Ueda et al. (2015) では, マツ花粉 MPN 法によってヤブレッツボカビ類の現存量が推定されている。この方法は, マツ花粉で釣りあげたヤブレッツボカビ類を寒天培地で培養することで, 確立的にヤブレッツボカビ類の細胞密度を推定する方法である。ヤブレッツボカビ類がマツ花粉への走化性をもつこと, 寒天培地上で増殖することが前提となる。そのため, ヤブレッツボカビ類がマツ花粉への走化性をもつこと, 抗生物質を含む寒天培地上で増殖することが前提となることから, マツ花粉 MPN 法による調査では, 見過ごされている系統群が存在すると考えられる。本研究では, 次世代シーケンサー解析を行うことで, より正確なラビリンチュラ類の群集構造の把握を目指した。

次世代シーケンサー解析の結果, 大阪湾では, ラビリンチュラ類は1年間を通して普遍的に存在していること, *Aplanochytrium* と *Oblongichytrium* は高頻度に検出され, 大阪湾の主要系統群であることが明らかになった。この結果は, Ueda et al. (2015) によって行われたマツ花粉 MPN による調査結果と一致した。さらに, Pan et al. (2017) によって新たに認識された系統群である LAB7 が高頻度に出現した。また, ラビリンチュラ類の構成系統群は季節変動しており, *Aplanochytrium* は年間を通して, *Oblongichytrium* は秋から冬にかけて, LAB7 は不定期に出現していることが明らかになった。さらに, 表層と底層の両方から検出される系統群と一方の層でしか検出されない系統群が存在した。*Aplanochytrium*, *Oblongichytrium*, LAB2

は表層でも底層でも検出されたが、*Ulkenia* と LAB4 は表層からしか検出されなかった。このことから、ラビリンチュラ類は、系統群ごとに適した水温や塩分が違い、棲み分けを行っていると考えられた。

本研究の次世代シーケンサー解析による調査と Ueda et al. (2015) によるマツ花粉 MPN 法による調査では、ラビリンチュラ類の構成系統群の季節変動に違いがみられた。マツ花粉 MPN による調査では、*Aplanochytrium* は夏から秋にかけて出現することが明らかになった (Ueda et al. 2015)。しかし、本研究で行った次世代シーケンサー解析による調査では、1年間を通して検出された。また、マツ花粉 MPN による調査によって *Oblongichytrium* が不定期に検出されていたが (Ueda et al. 2015)、本研究で行った次世代シーケンサー解析による調査の結果、秋から冬に検出された。出現する時期が長くなったことは、ラビリンチュラ類を検出する手法の違いによると考えられた。前述したように、マツ花粉 MPN 法では、検出されやすい系統群とされにくい系統群が存在し、把握できるラビリンチュラ類の系統群に偏りがでてしまうと考えられる。一方、次世代シーケンサー解析は、環境 DNA から群集構造を解析するため、把握できるラビリンチュラ類の系統群に偏りが少ないと考えられる。本研究では、環境 DNA からラビリンチュラ類の群集構造解析を行うことで、培養法では検出が困難な系統群の検出と季節変動をより詳細に把握することができた。しかし、次世代シーケンサー解析では、ラビリンチュラ類の状態を把握することができない。例えば、マツ花粉 MPN 法は生きている細胞のみを検出することができるが、次世代シーケンサー解析は生きている細胞だけでなく死んでいる細胞も検出してしまふ可能性が高い。また、動物プランクトンの消化管内に残留しているラビリンチュラ類や糞便内のラビリンチュラ類も検出してしまふと考えられる。次世代シーケンサー解析だけでなく、FISH やアクリフラビン直接計数法などで野外サンプルを観察することで、ラビリンチュラ類の環境中での状態を把握する必要がある。

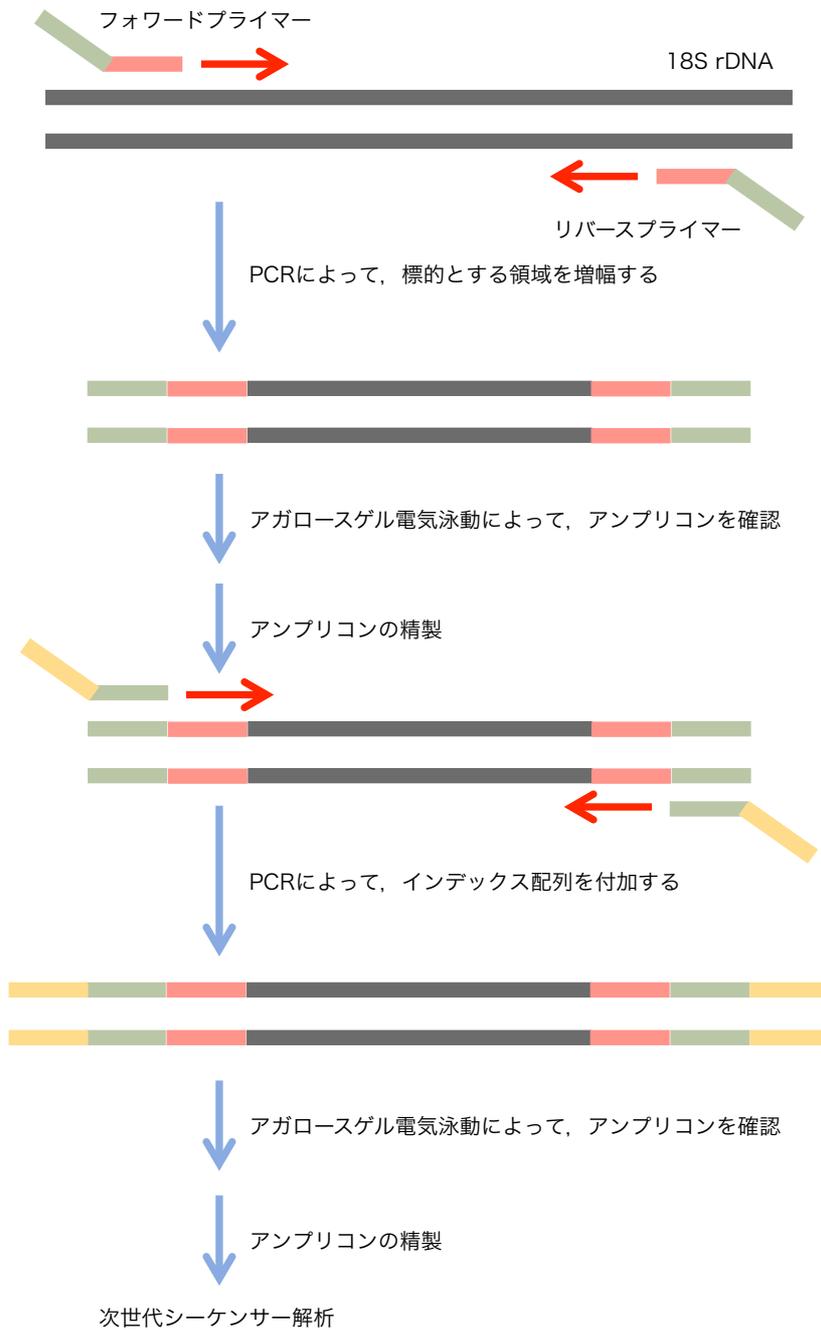


図5-1.2段階 PCR によるライブラリー調整

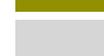
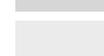
2段階 PCR によってライブラリーを調整した。**標的とする領域に特異的な配列**と**アダプター配列**を含むプライマーを用いた 1st PCR を行った。次に、得られたアンプリコンを精製し、**アンプリコン配列**と**インデックス配列**を含むプライマーを用いて 2nd PCR を行った。得られたアンプリコンを精製し、次世代シーケンサー解析を行った。

ラビリンチュラ類

(a) Ueda et al. (2015),  
Honda et al. (1999) に基づいた分類

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

	アプラノキトリウム類
	オブロンギキトリウム類
	狭義のラビリンチュラ類
	狭義のヤブレツボカビ類
	その他の系統群

	Amphifilidae group
	<i>Aplanochytrium</i>
	<i>Aurantiochytrium</i>
	<i>Botryochytrium</i>
	<i>L. haliotidis</i> group
	LAB1
	LAB2
	LAB4
	LAB5
	LAB6
	LAB7
	LAB8
	LAB9
	LAB10
	LAB14
	LAB15
	LAB17
	LAB20
	<i>Labyrinthula</i>
	Labyrinthulida ANT10_3
	<i>Oblongichytrium</i>
	<i>Parietichytrium</i>
	Quahog parasite group
	<i>Sicyoidochytrium</i>
	<i>T. aureum</i> group
	<i>T. kinnei</i> group
	<i>T. striatum</i> group
	Thraustochytriidae
	Thraustochytriidae HK10
	Thraustochytriidae SEK690
	<i>Ulkenia</i>

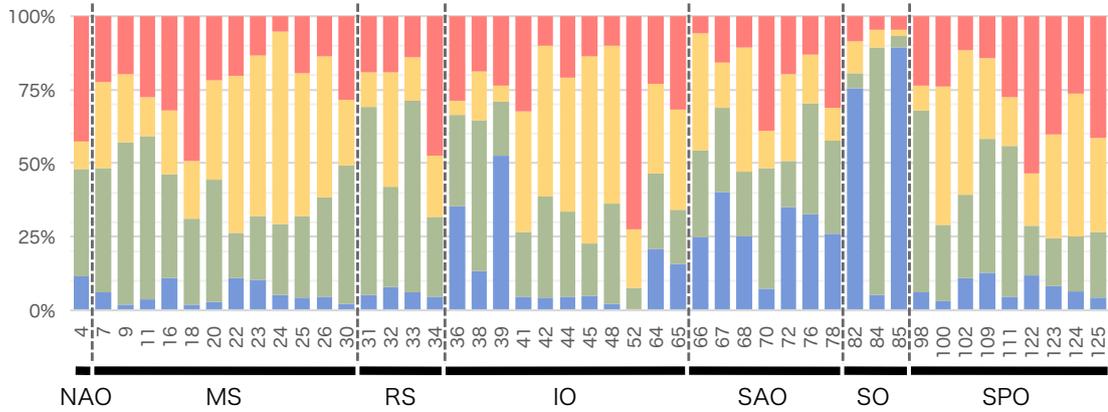
8大系統群

	その他
	ハプト藻
	クリプト藻
	アメーボゾア
	リザリア
	ケルコゾア
	アルベオラータ
	ストラメノパイル
	盤上クリステ類
	植物
	オピストコンタ

図5-2.系統群の凡例

(A) 表層水 [surface : SUR]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

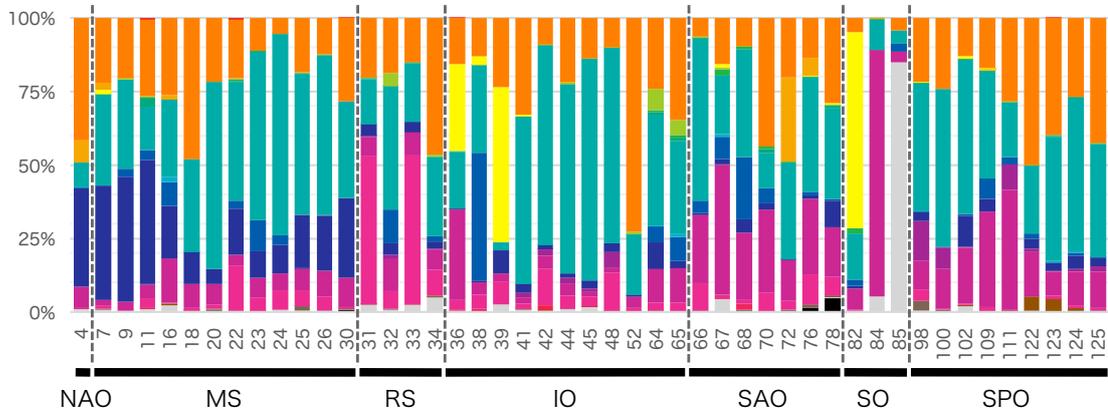


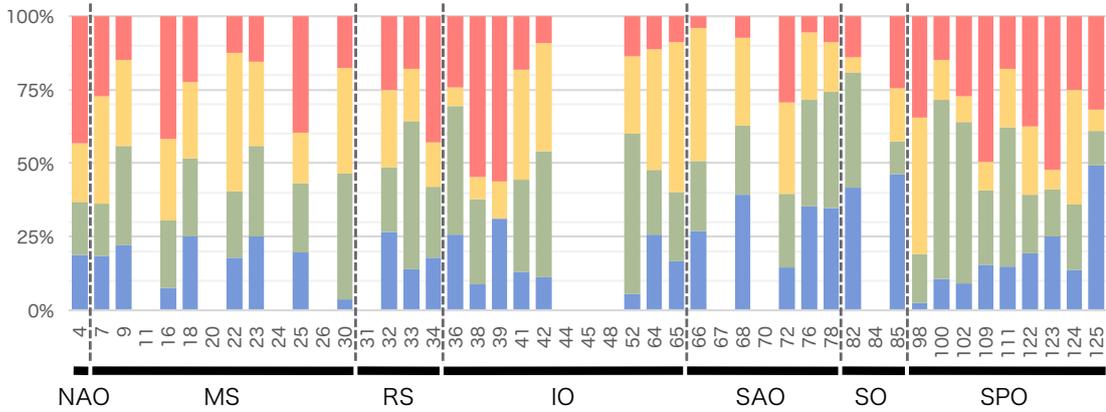
図5-3.

TARA OCEANSの全サンプリング地点におけるラビリントウ類の主要な系統群の相対的な割合

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(B) クロロフィル最大層 [deep chlorophyll maximum : DCM]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

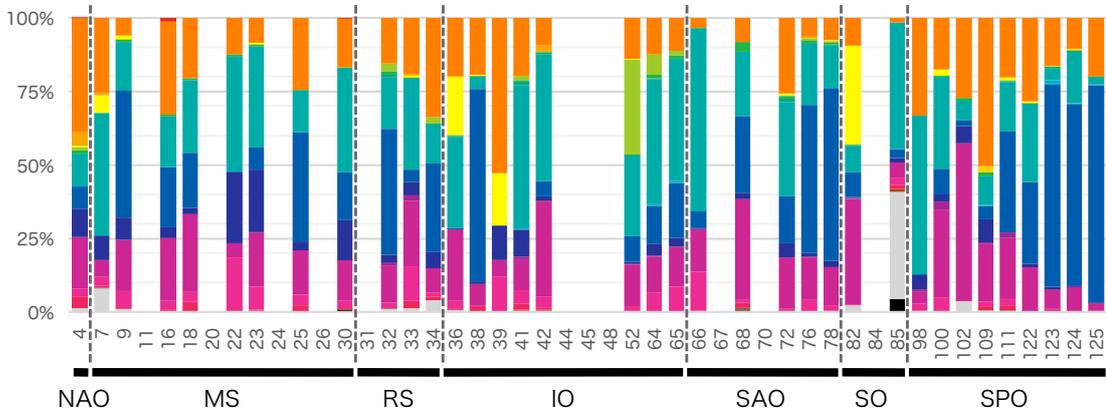


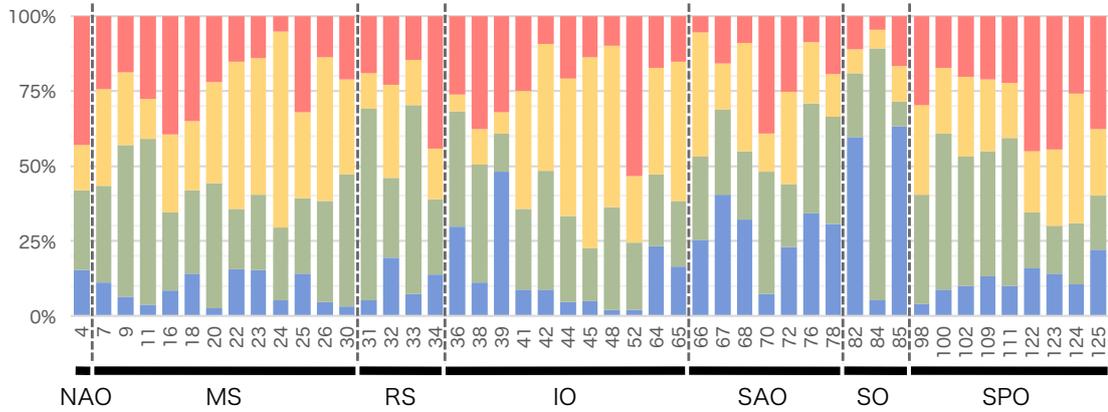
図5-3.

TARA OCEANSの全サンプリング地点におけるラビリントウ類の主要な系統群の相対的な割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(C) 表層とクロロフィル最大層を併せた場合

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

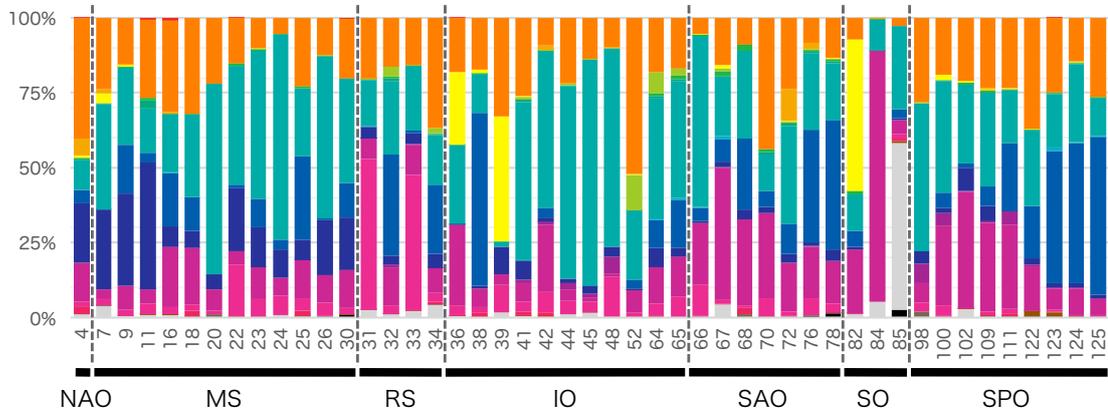


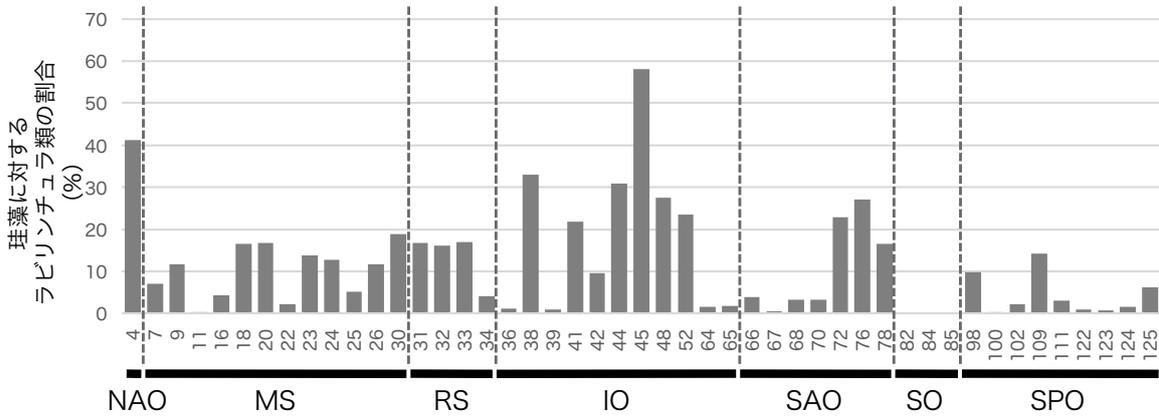
図5-3.

TARA OCEANSの全サンプリング地点におけるラビリチュラ類の主要な系統群の相対的な割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(A) 表層 [surface : SUR]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

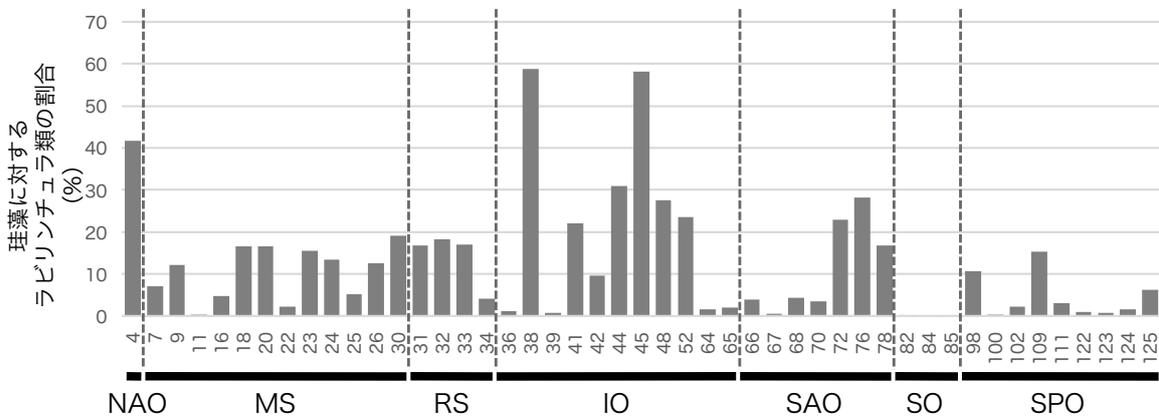
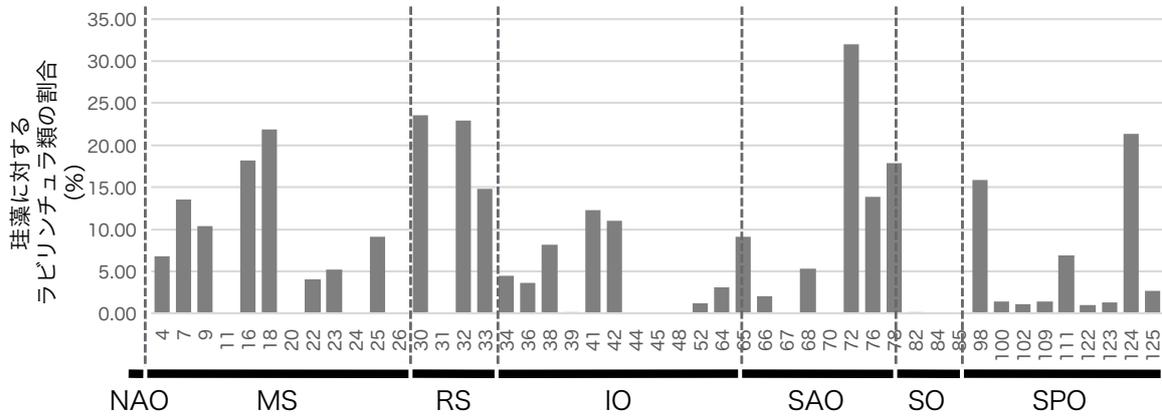


図5-4.TARA OCEANSの全サンプリング地点における珪藻に対するラビリントチュラ類の割合

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(B) クロロフィル最大層 [deep chlorophyll maximum : DCM]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

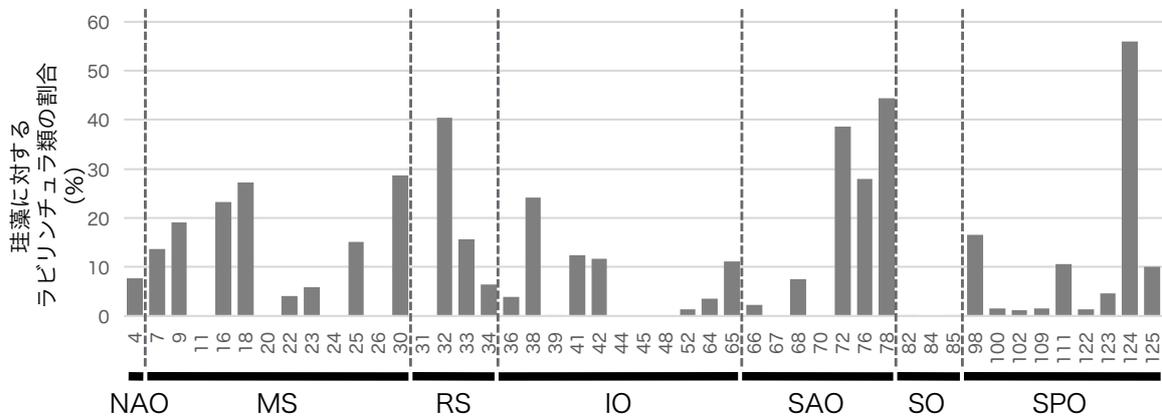
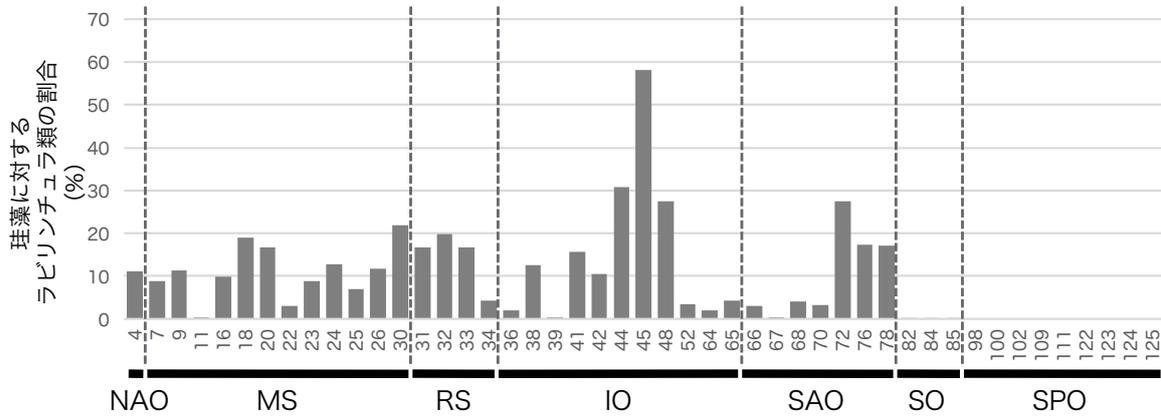


図5-4.TARA OCEANSの全サンプリング地点における珪藻に対するラビリントウラ類の割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(C) 表層とクロロフィル最大層を併せた場合

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

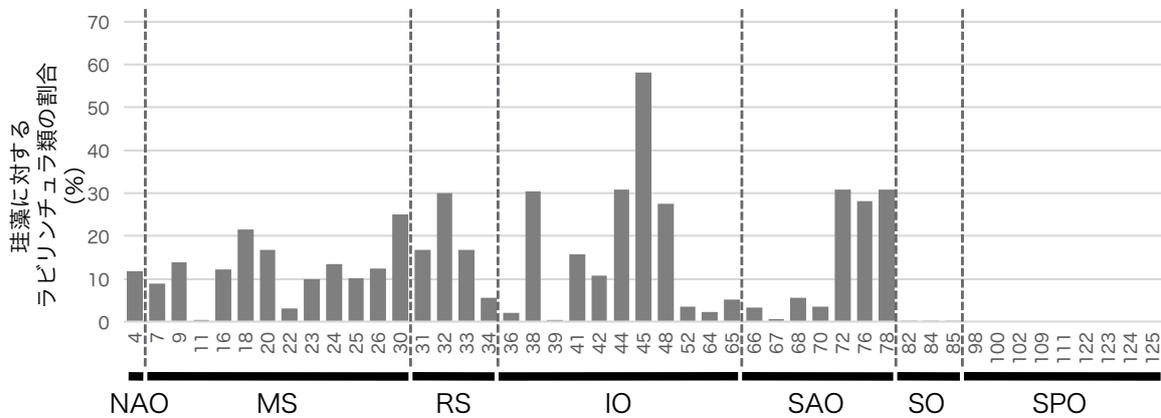
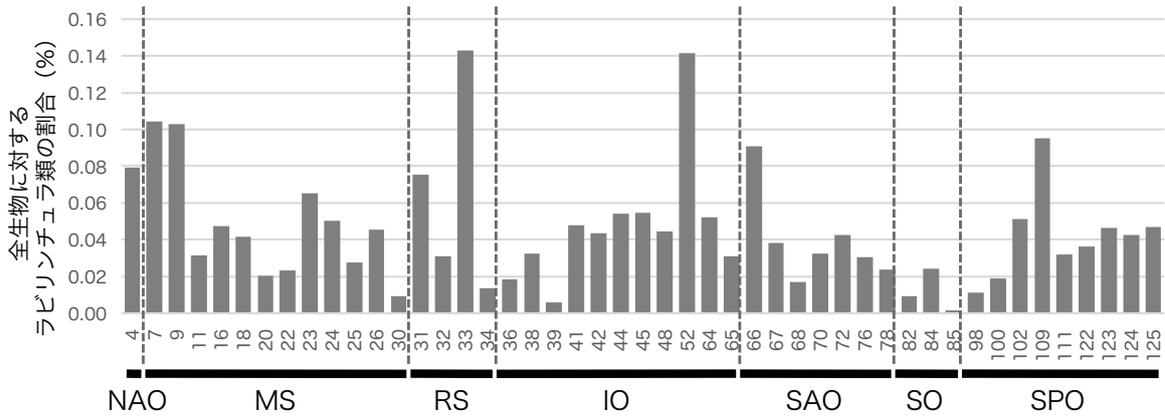


図5-4.TARA OCEANSの全サンプリング地点における珪藻に対するラビリントチュラ類の割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(A) 表層 [surface : SUR]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

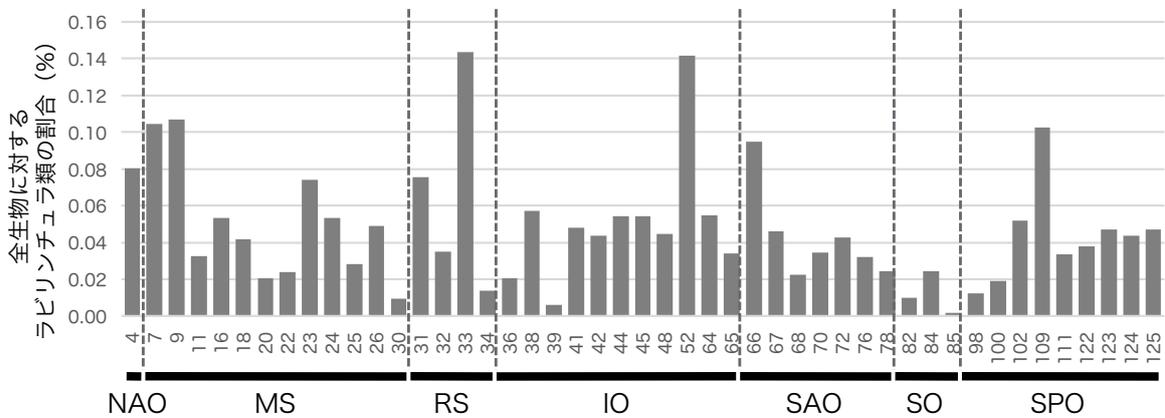
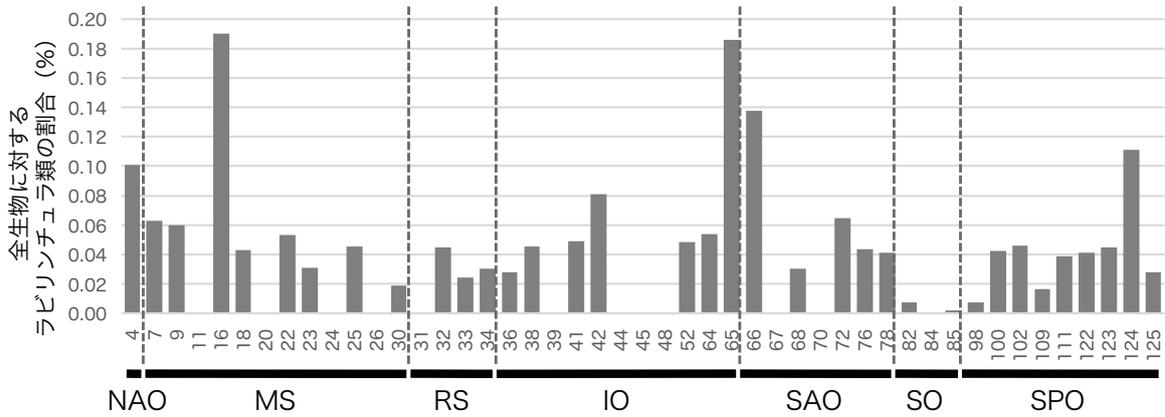


図5-5.TARA OCEANSの全サンプリング地点における全生物に対するラビリンチュラ類の割合

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(B) クロロフィル最大層 [deep chlorophyll maximum : DCM]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

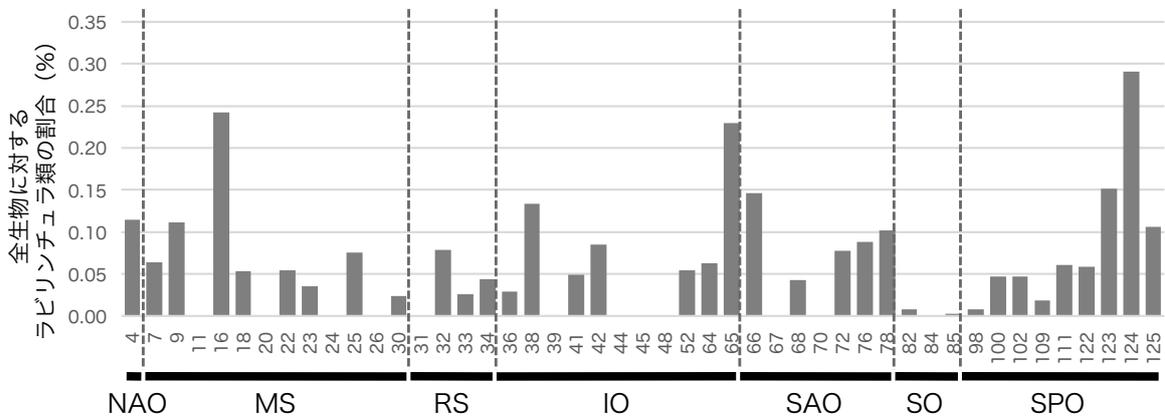
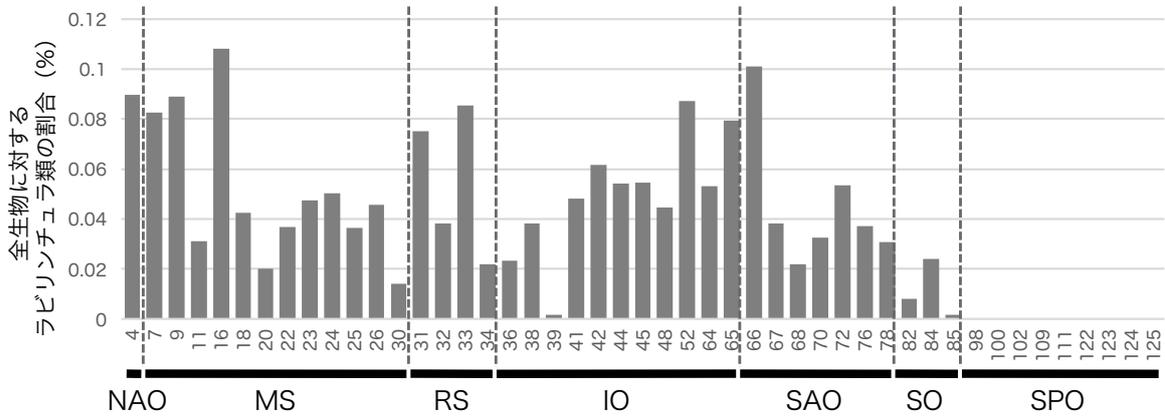


図5-5.TARA OCEANSの全サンプリング地点における全生物に対するラビリンチュラ類の割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(C) 表層とクロロフィル最大層を併せた場合

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

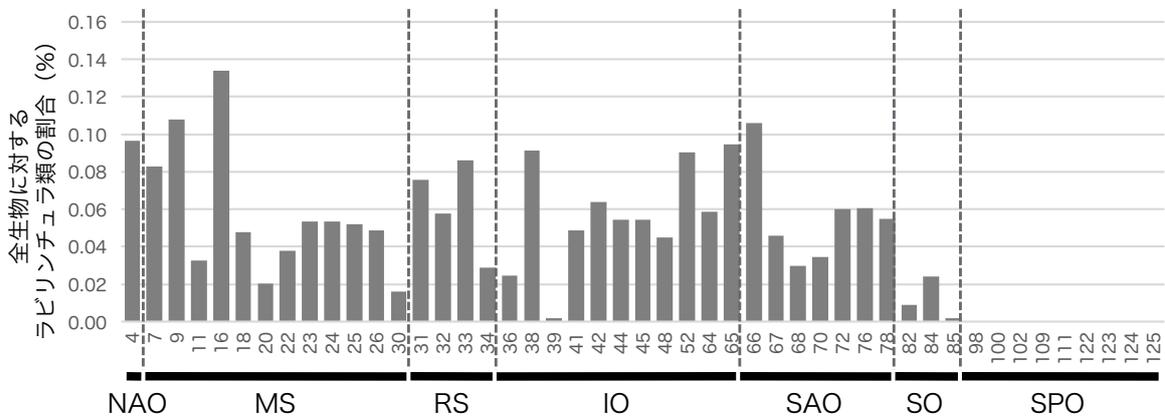
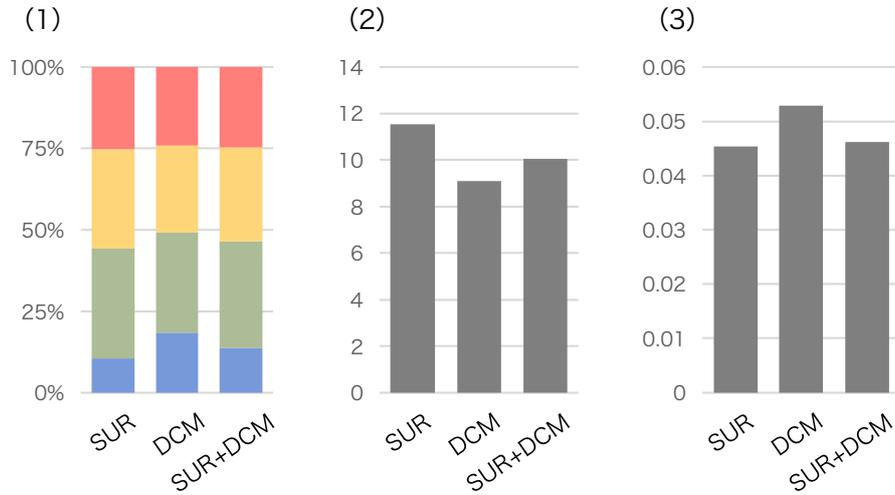


図5-5.TARA OCEANSの全サンプリング地点における全生物に対するラビリンチュラ類の割合 (続き)

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(a) Ueda et al. (2015), Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

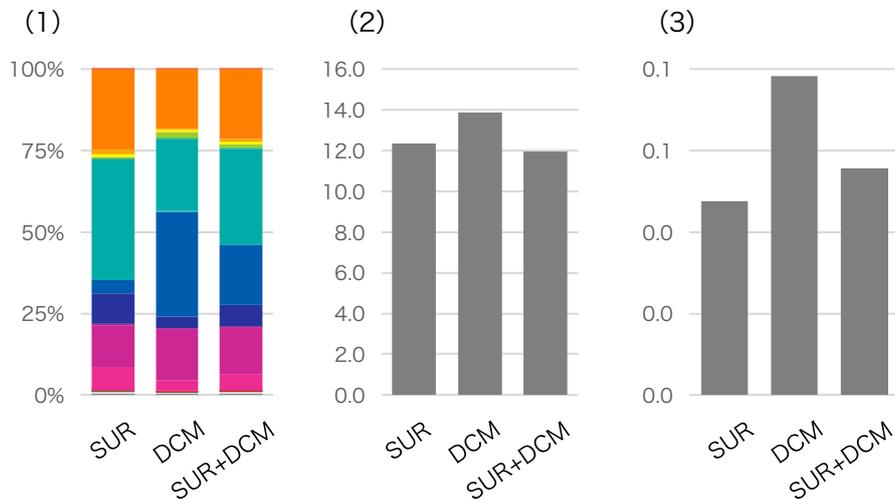


図5-6.

TARA OCEANSの全サンプリング地点における解析結果 (A：表層, B：クロロフィル最大層) と平均 (C)

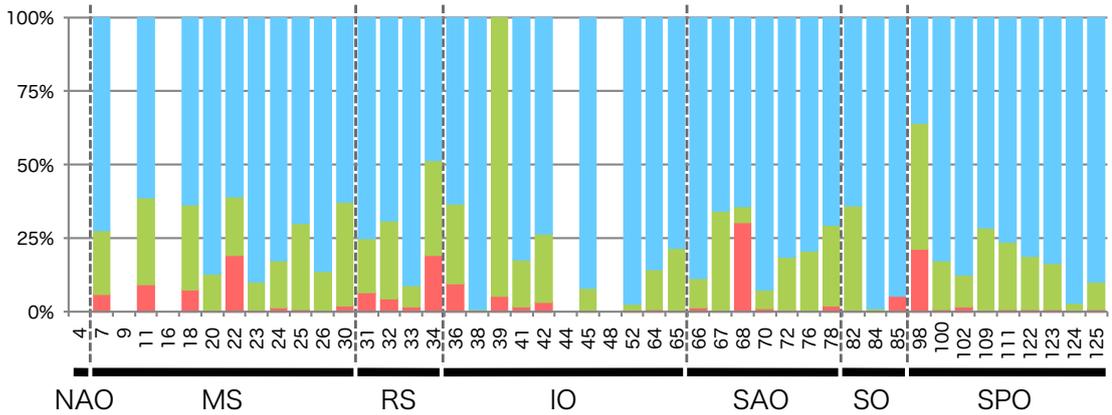
- (1) ラビリンチュラ類の主要な系統群の相対的な割合
- (2) 珪藻に対するピリンチュラ類の割合
- (3) すべての生物に対するラビリンチュラ類の割合

SUR：表層水

DCM：クロロフィル最大層

SUR+DCM：表層とクロロフィル最大層を併せた場合

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類



(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

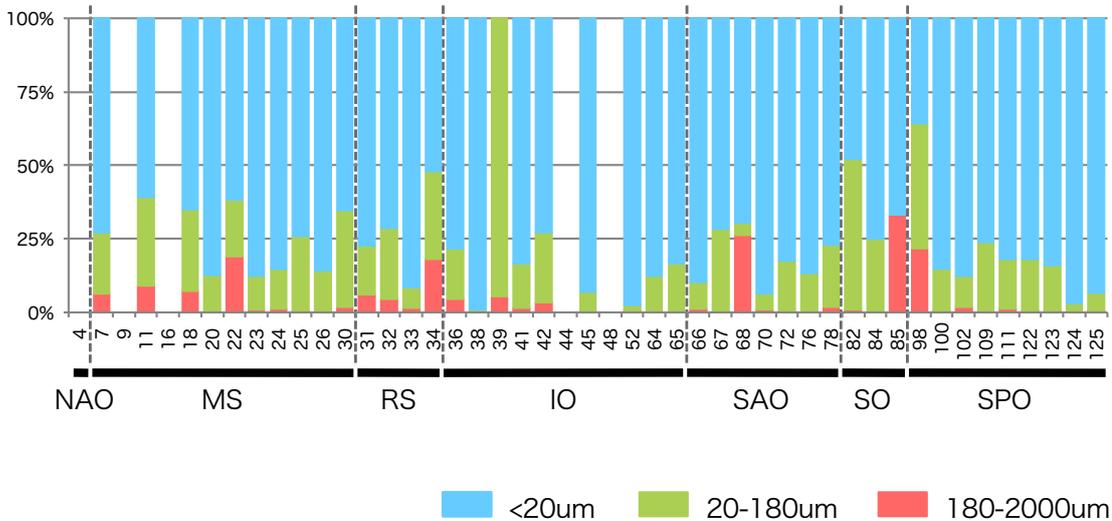


図5-7.各サイズ分画の相対的な寄与

*Aplanochytrium* が環境中で集合体を形成している可能性を検討するため、 $<20\mu\text{m}$ 、 $20\sim 80\mu\text{m}$ 、 $180\sim 2,000\mu\text{m}$ の3つのサイズの画分に分けて、それぞれのサイズ画分が寄与する割合を算出した。サンプリング地点82は、孔径 $180\mu\text{m}$ のフィルター代わりに $200\mu\text{m}$ のフィルターを使用している。

- NA : 北大西洋 [North Atlantic Ocean]
- MS : 地中海 [Mediterranean Sea]
- RS : 紅海 [Red Sea]
- IO : インド洋 [Indian ocean]
- SAO : 南大西洋 [South Atlantic Ocean]
- SO : 南極海 [South Ocean]
- SPO : 南太平洋 [South Pacific Ocean]

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

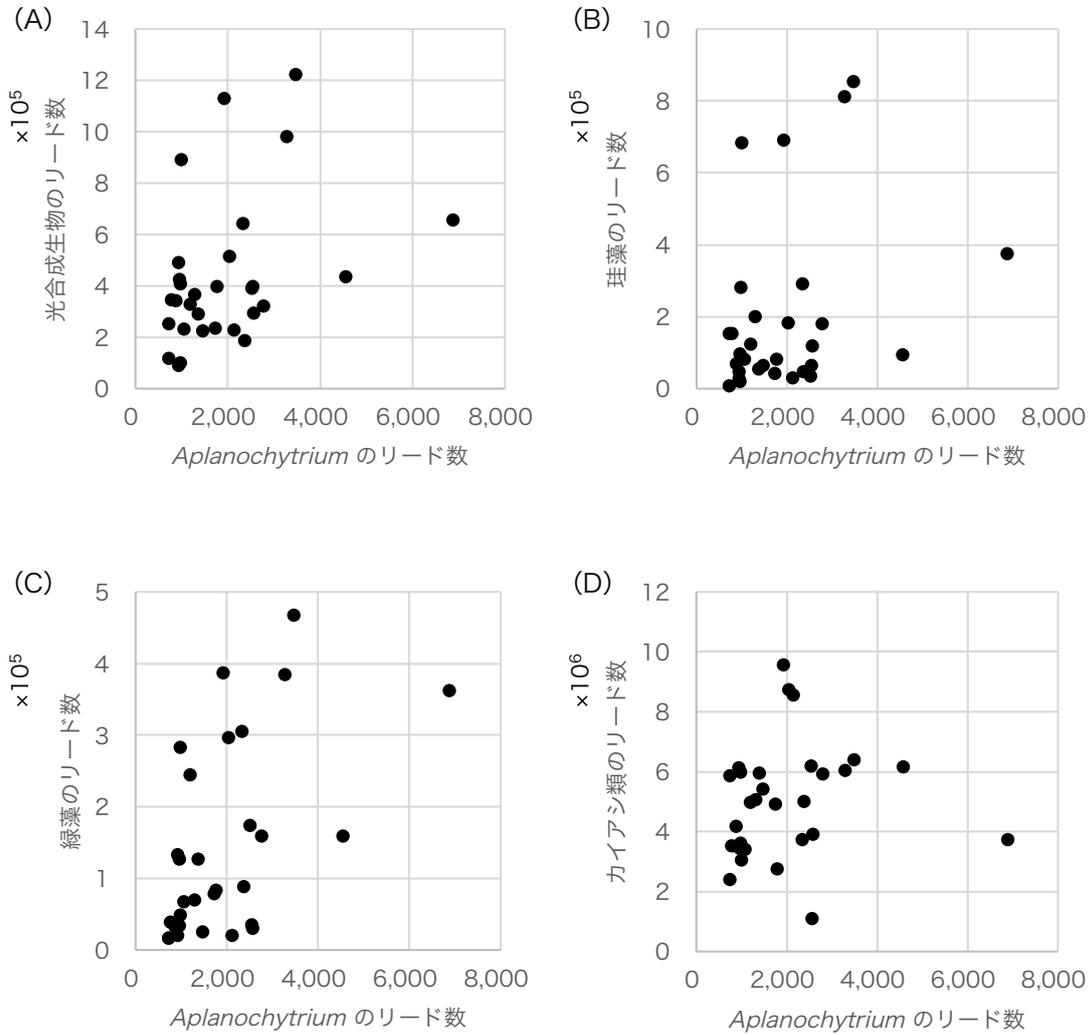


図5-8. *Aplanochytrium* と被捕食者/捕食者の相関関係

*Aplanochytrium*と捕食-被食の関係にある生物との相関を把握するために、*Aplanochytrium*のリード数が豊富なサンプリング地点上位30位を対象とし、*Aplanochytrium*のリード数と、光合成生物（渦鞭毛藻類を除く）、珪藻、緑藻、カイアシ類のそれぞれのリード数との相関分析を行った。

(A) 渦鞭毛藻類を除く光合成生物 ( $r=0.388$ ,  $p=0.034$ )

(B) 珪藻 ( $r=0.323$ ,  $p=0.081$ )

(C) 緑藻 ( $r=0.535$ ,  $p=0.002$ )

(D) カイアシ類 ( $r=0.123$ ,  $p=0.517$ )

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

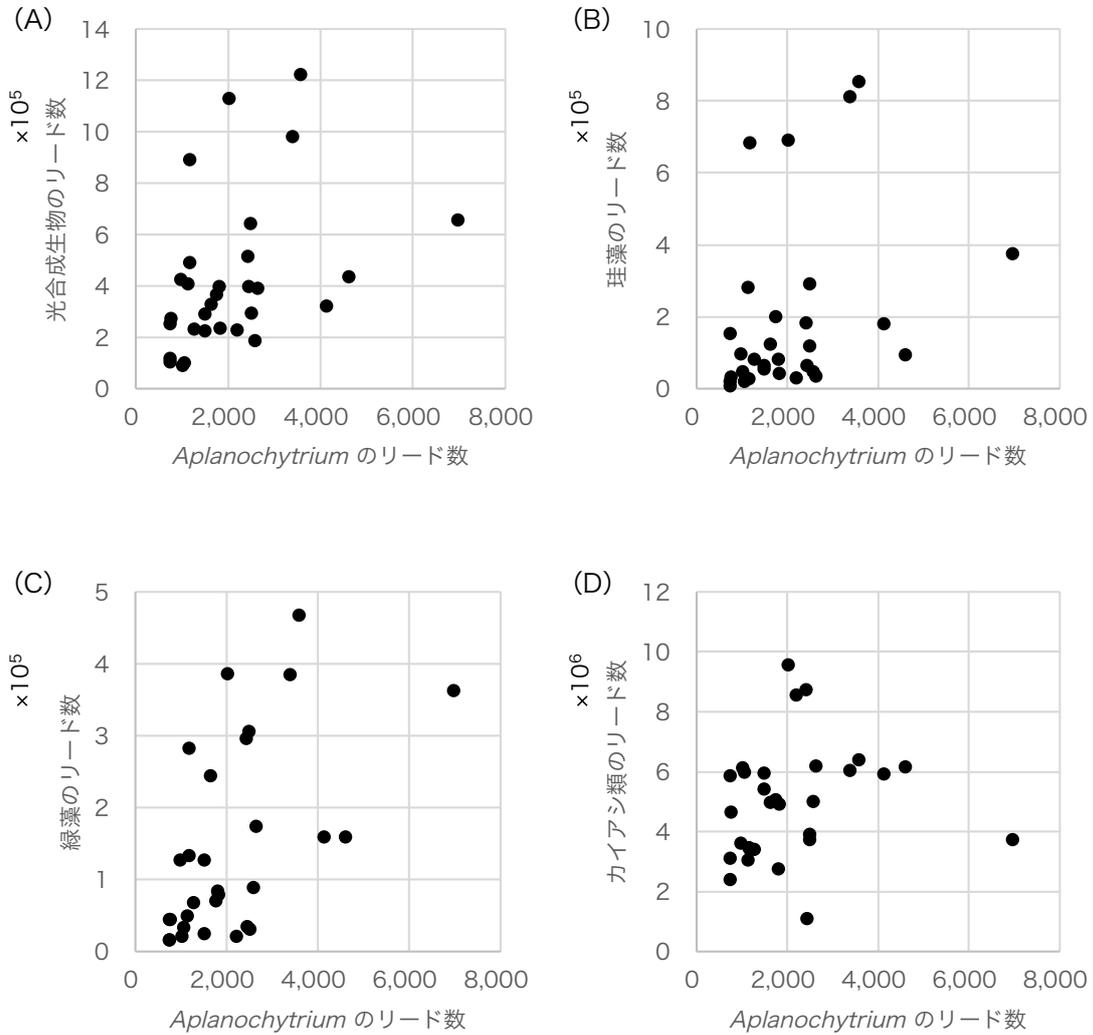


図5-8. *Aplanochytrium* と被捕食者/捕食者の相関関係 (続き)

*Aplanochytrium*と捕食-被食の関係にある生物との相関を把握するために、*Aplanochytrium* のリード数が豊富なサンプリング地点上位30位を対象とし、*Aplanochytrium* のリード数と、光合成生物（渦鞭毛藻類を除く）、珪藻、緑藻、カイアシ類のそれぞれのリード数との相関分析を行った。

(A) 渦鞭毛藻類を除く光合成生物 ( $r=0.401$ ,  $p=0.028$ )

(B) 珪藻 ( $r=0.341$ ,  $p=0.065$ )

(C) 緑藻 ( $r=0.552$ ,  $p=0.002$ )

(D) カイアシ類 ( $r=0.160$ ,  $p=0.399$ )

A.8大系統群

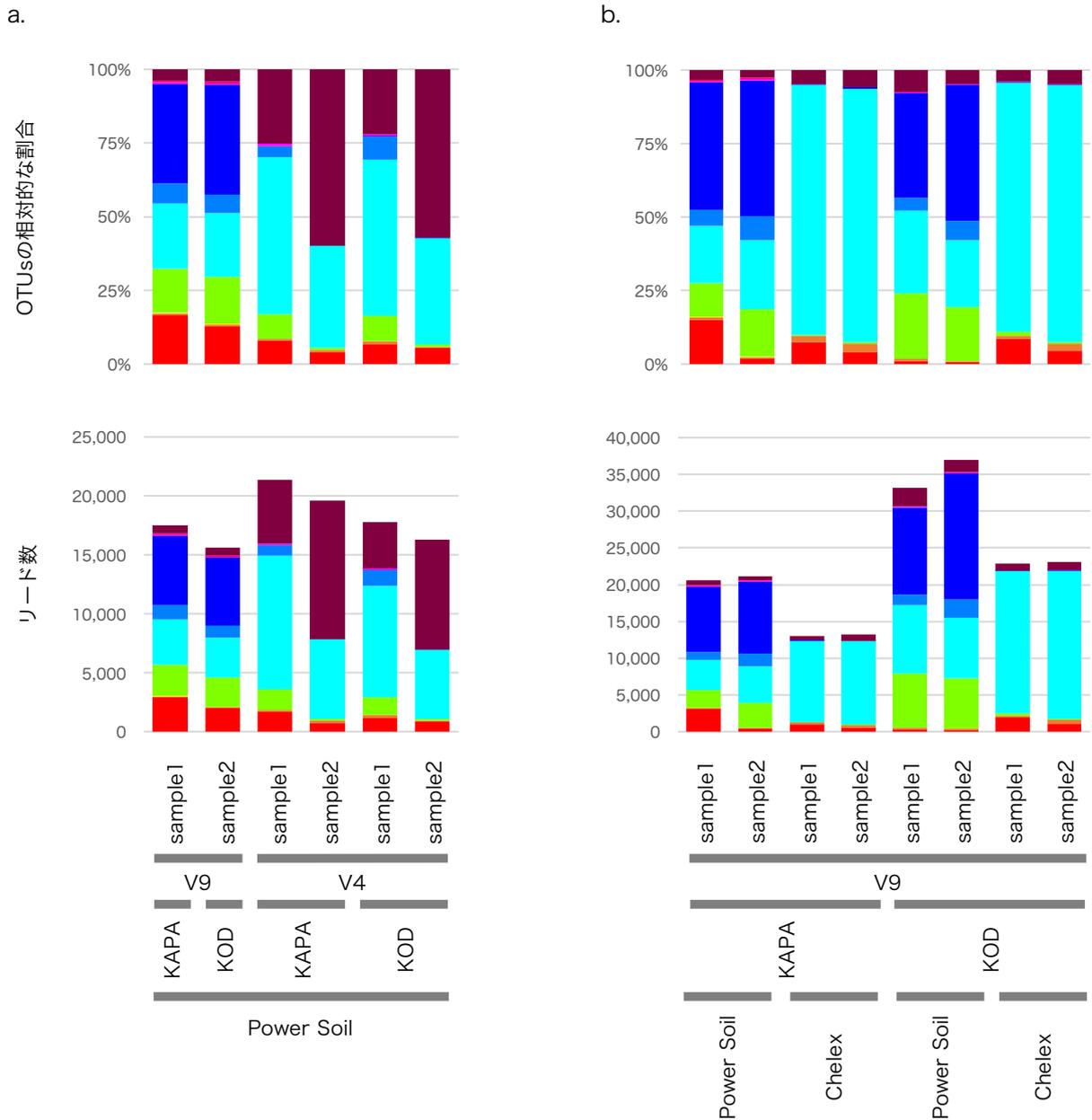


図5-9.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み

1st PCRで使用する1st PCRプライマー、次世代シーケンサーに適したDNA抽出法、PCR酵素を検討した。検出されるリード数の多さと生物群の多様性から、次世代シーケンサー解析に適しているかを判断した。

B.ラビリントウ類

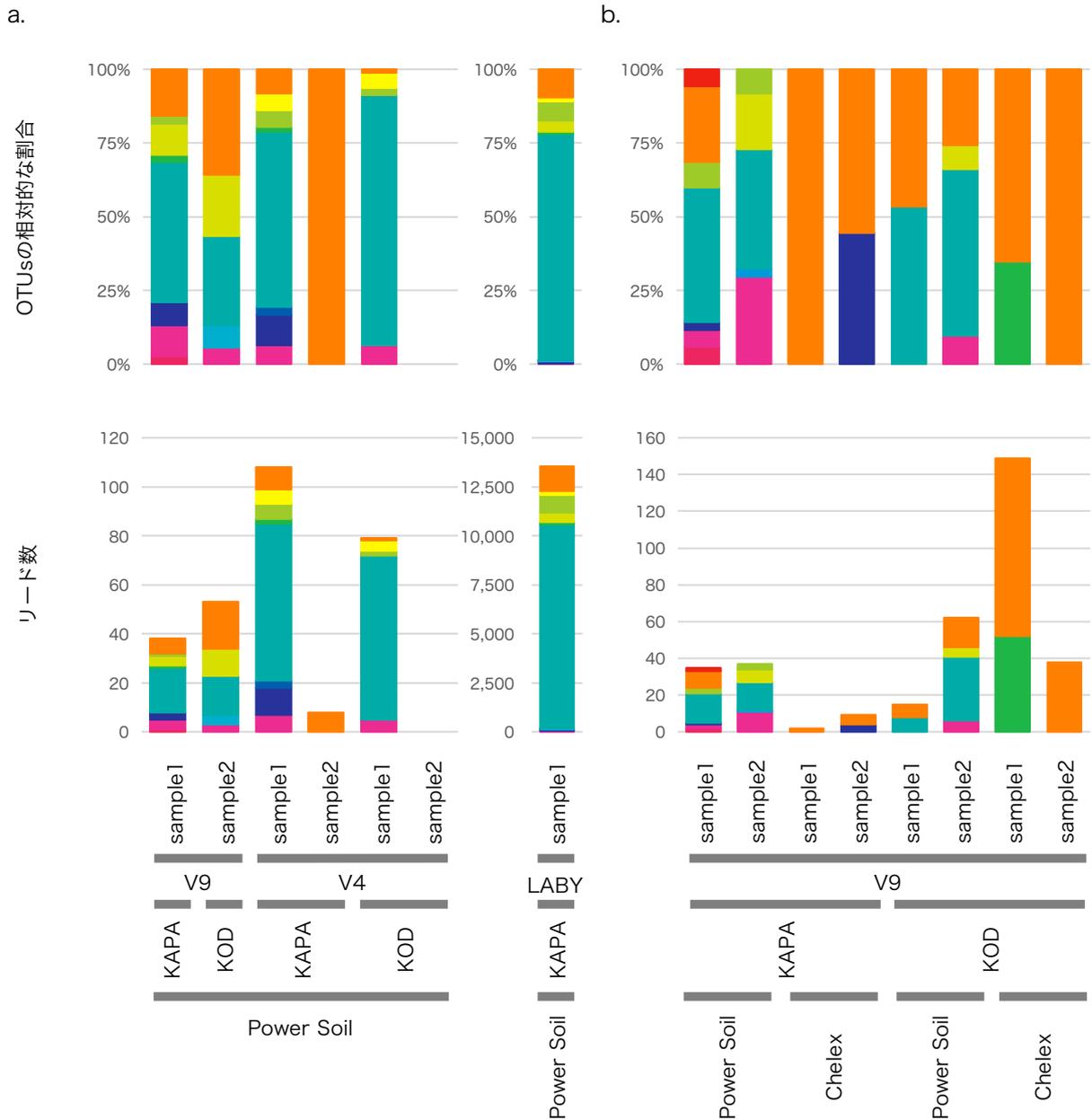


図5-9.次世代シーケンサー解析によるプランクトンの群集構造解析に向けた取り組み（続き）

1st PCRで使用する1st PCRプライマー，次世代シーケンサーに適したDNA抽出法，PCR酵素を検討した。検出されるリード数の多さと生物群の多様性から，次世代シーケンサー解析に適しているかを判断した。

(a) Ueda et al. 2015, Honda et al. 1999に基づいた分類

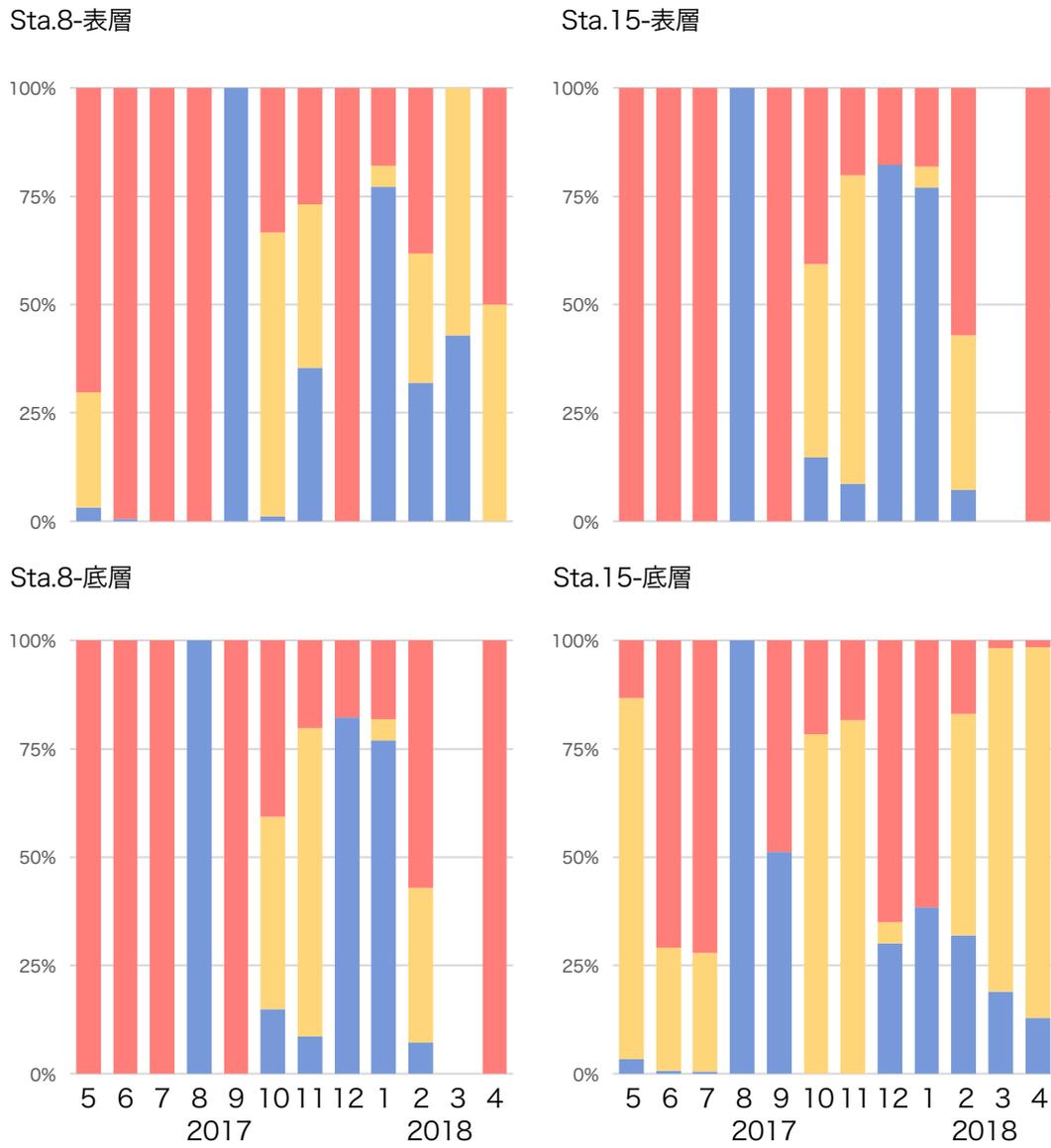


図5-10.次世代シーケンサー解析でラビリントウラ類の群集構造解析

次世代シーケンサー解析によって、大阪湾に生息するラビリントウラ類の群集構造解析を行った。ラビリントウラ類の主要な系統群の相対的な割合を示す。

(b) Pan et al. 2017に基づいた分類

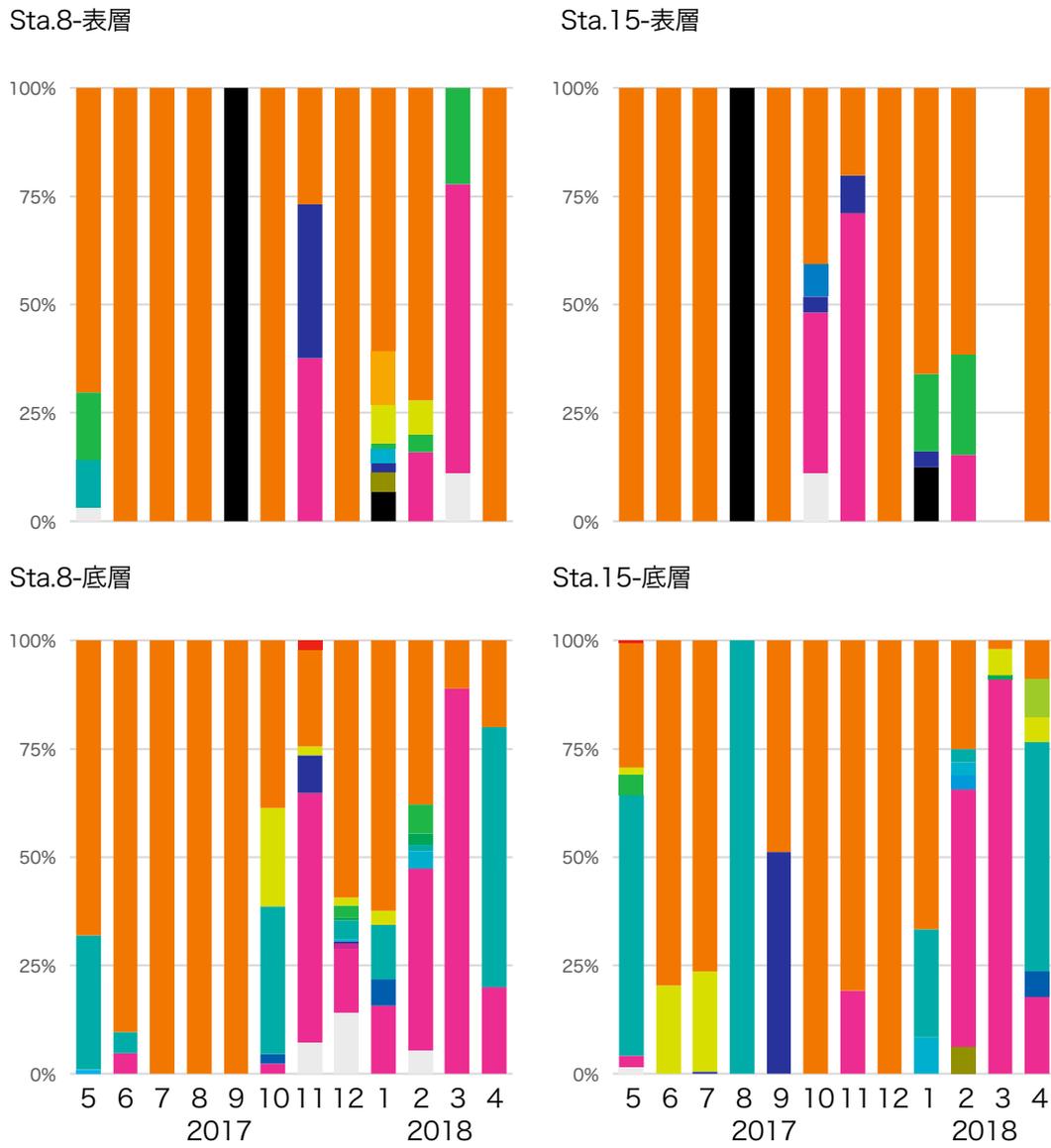


図5-10.次世代シーケンサー解析でラビリントラ類の群集構造解析（続き）

次世代シーケンサー解析によって、大阪湾に生息するラビリントラ類の群集構造解析を行った。ラビリントラ類の主要な系統群の相対的な割合を示す。

表5-1. 次世代シーケンサー解析で使用したプライマーセット

ターゲット領域	プライマー	配列 (5'→3')	長さ (bp)	位置	アンプリコン (bp)	引用文献
1 V4-V5	TAREuk454FWD1-laby	CCAGCASCYGC GGTAAYTCC	20	563-582 †	415 †	Stoeck et al. 2010 改変
	TAREukREV3 -laby	RYTTTCGTTCTTGATYRA	18	960-977 †		Stoeck et al. 2010 改変
2 V7-V9	SSU-F1289	TGGAGYGATTTGCTGGTTDATTCCG	26	1289-1314 †	484 †	Tanabe et al. 2015
	SSU-R1772	TCACCTACGGAAACCTTGTACG	23	1750-1772 †		Tanabe et al. 2015
3 ラビリンチュラ類 特異的領域	LABY-A	GGGATCGAAGATGATTAG	19	944-961 §	435 §	Stokes et al. 2002
	LABY-Y	CWCRAACTTCCTCCGGT	18	1361-1378 §		Stokes et al. 2002

† *Chlamydomonas reinhardtii* (M32703) を参照配列として使用した。

§ *Labyrinthulid quahog parasite* QPX (AY052644) を参照配列として使用した。

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## アブラノキトリウム類

OUT #	OUT code	# of read
1	4bdd337dc496d45cfd1f62f0cd51b8d1	58497
2	1ff80d085fd6b76bc4fd9ae683b2838f	1252
3	805bf64c779619c75e161f17de75901e	478
4	962055636af95d80ae08dd1ba4ea360e	386
5	675324ab17b10b7ac11fa7698e490896	357
6	78d823d2d81ae3251e72d9f4ba360c62	357
7	efd98c9e0af5b20e281b46b2bba2b596	291
8	ea1607b0181b3181796d9d859024fc24	277
9	e2db29d2f18ca3678c8ee3420bd5cc16	239
10	ed2c863bf4bbad1afffb4935233ec363	219
11	1f658b5910bc5fb6bf54270e882f1c8c	211
12	fded7939edd5fcd5044d1a1c54323ba7	128
13	70c6d58dbe226b9648043ebe2cf17acb	118
14	44fa63447a971cad23515284a4f6b887	112
15	72bc078fcd56964d69479cf05f011317	100
16	67f0daa6d6fad911f4949cf7f20d6f3	74
17	b4467ceacda741ca130dde56302caa7b	48
18	9127dfec0dde3bd91e248c833a5c9716	38
19	60c67c1aee5f36f7e8a638d35d2f0886	27
20	f980c4ed1550359a29c5c413bfc23c19	18
21	08c3c5adfbbb14e9bf1819465d2e3453	17
22	1cf040143d2601123731ec130801d1ff	14
23	bcbffe8f41ab6bd611ab4d25fc14114b	13
24	751e79dd4462a49a486d3ea4b0b253f7	12
25	dd60bd20c1aea11263ea40a65bf0b72	12
26	e68d515d76058ffbf4c57a920f3d529c	12
27	cc23c29e51d515db63f0e577131b8fad	9
28	982679211a910a1d4e4e080f7932aab3	8
29	e3b8f0c27eedfa4701af58d4a6eed93f	8
30	86864f712cd44a19603118ecfd2998f2	7
31	b7d1e2dcb79f3061d1a25e8ddbd72cd5	7
32	0258763ddb7c5f72409234f8362f5f0	6
33	50c8dd31a46b56821889968cc8ec002b	5
34	b23e3f0f0a3f42e4ce99facc2c185ae	5
35	73f0937bae7e99a39fd4114584557b72	4
36	c49e15bd13b324de6b75100220957c84	4
37	cfc43f1be533bd672ad6e021f19eafa6	4
38	1d1f20432346572a1385e68fe22763ee	3
39	3424673363b30d95cab284c229352a67	3
40	5fe7964b6afb006149af09d0501baea9	3
41	608f16d278b2ca80bb9c4553f28452c1	3
42	7c11beedd1493d4b45a24881dff67b47	3
43	496fcf3a63d99e662e56230ec7653edc	2
44	1c1bcd4a786f9a335c41ad71385a3ad	1
45	5133d7c348cc35e0eae8452f97a9d60a	1

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同日したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## オブロンギキトリウム類

OUT #	OUT code	# of read
46	a17905132d3331696d69a6eec215b165	33670
47	0e1868375a02a9fc540f85bb6b80505c	26278
48	bedcd7f6edb5ef006a5dcec216b61684	8169
49	ed94b9b25767a068ffe0bf91f36207b6	1918
50	338a28778065fe0657e66e8153ca0dd8	692
51	e75485294619fd885c8e48be0caec93f	533
52	e6abbec2c843054bea7762f48e8d444e	407
53	1211ceba4f9a57ebc9e45854c20b1b6d	331
54	d71cf53db823f269b7aa3a605395eaa8	268
55	5bc4cd01621b4b9231f1b148732a8dc7	236
56	f3746150301cdac46b6c496e50bd7386	203
57	a2b282ff32610de026a7d9d5cd53c8b9	183
58	1987cef92ab9c78f2d95b69f82d8e0b9	173
59	a9eccdc8c856a80f45d25ab67cef65ed4	162
60	bceccd928e1f78fb949a52187792c54e	104
61	9aa288360d4808b5be9adf0fd3c1f5b9	81
62	bd8d2b26d56b17fb8a2b068b8228cee5	61
63	e7be89637e3bf5aaaa47b9426e7d4ed1	28
64	4ff215d9703ffe03ffeda797a1c864a6	23
65	9884306e46612502c6228cc4d126b914	23
66	558b0b95520fc8acbfab2e2d91add871	21
67	29add138cdb5b8c01dd63a5c6247f8e7	19
68	a0bde2b89286e7125b5585cad4282aa	19
69	f0311a7af3a016256e6e3236f4b7f050	17
70	5b6fa9ab4d87e485c94b7e06c51900e2	15
71	b9fe46271e5369aaa215b836db8059e1	12
72	634bf915c98e17a80ac8ac86c74a9057	11
73	a7a087fbe89374eedbc67516528512bf	10
74	5cc9b8571c28c668ae28d2876724f053	8
75	0ad9e32d01ddc60dfcd57d4e9116d6ce	7
76	7d567fa706e81bd68a2741639b79ed44	7
77	2332821f6297a6866bae2b5844074a75	6
78	7d340630552cd7464a51e8a495b7cdbc	6
79	be17c93cf1acbd5f50ec261c2bf1552c	6
80	3f79fb94bf9b55ede32ce12304294ecd	5
81	570facf3eb2ed66b3c26dbef4cfc2f85	5
82	b3075691009b51e1c4efd621d21afc7c	5
83	c4336e625cfb0080be64e8103ee912e2	5
84	d0d6b9c699e9e87f27cbcb495b05e061	5
85	e9ee8df9254e7e6ba5d91b8e63a3864a	5
86	1f083c7da57aa74567d70af7af45a009	4
87	3085443d7ceee391ec3bbfc22edbbade	4
88	4a561ae9ef865304c18cdd8fe4991213	4
89	84e8ea9092c35b4143ffb3ea77eaa603	4
90	9f9fd2706aa7d02d717e49728e83f379	4

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## オブロンギキトリウム類

OUT #	OUT code	# of read
91	bd9395ff3879751cd074a60694bb09e3	4
92	f9a8a81f66870d0616a1566256ae95ef	4
93	1618798f865a8a56817b36a4213a85f9	3
94	3957d6a1fbcc1240159f7ddc37024090	3
95	6aca984d2cc5d36318dcbc812f1b99f4	3
96	7942f1d88381bdfbdebe99a10561bc73	3
97	7b27093121b182e1a5531581a7f304e6	3
98	986fa4e19e0b1edc10222fd65bc7049b	3
99	9ecd6060d836de6a04c438c93eaf270a	3
100	c2f17c2fa57e5dd4200541449d823cc9	3
101	c6e45ccf913e289d8c6edbbec968bd71	3
102	cceaf6f4244957c852268e719756b011	3
103	f2de9883cf5a01373c4be70c6873fe37	3
104	38c4dfc755cc4a3cdd94e941cedbd246	2
105	7542f5d7334d1ca30b0163d8c4d0d25a	1

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## 狭義のラビリントラ類

OUT #	OUT code	# of read
106	264b99017913aec3e7160a25b071aa71	22018
107	d3e1bbe4c5a6906e7794e528abdd40e	12083
108	ed77a91dca6408bedfdb6805e1f3bc3	10822
109	a7607486fb7d05b4edf332c228a5b74a	8483
110	358eca818ab8d85290d9ae4003e5086a	7661
111	8a849dbbb3a48634e74e00b509617dcc	3254
112	942f2796eaf505c0ef0bd03ca7da10a4	2916
113	f513214b061518e07b3c25ffb135af4d	2653
114	6f17f30cc973169296b137122835dfcb	2461
115	c0a61cd47f4ec8515a128fc8ea071c2e	2037
116	45f243aa1b74378224828726523899b1	1239
117	6db17c966368eb25675bb5cc4706e605	1232
118	f0e927105b237e2194dd04db415729da	1110
119	72e2c282f089af75298a19e78a99ee76	833
120	4c5b892187c4f5e077d25122484fc9c	584
121	a8cb5bbd976961b73affaf50c6efe33	500
122	b9a2c6a6391be79300b6b89281be2dae	287
123	051ccbc9d546bae7505e0d05eccb3c16	248
124	289ae5ecdf612791883395622131b37e	216
125	da7d67354de72a8bda1fc5aa4c20c815	209
126	c8824a94780fcfad10667e4860808810	142
127	2b8e510c0b1034cc704d2baeb620546e	125
128	a8400533d62ee29bd87bc4e1d5123009	120
129	d672245b2601f5201513bdfac86aa117	111
130	69c33b6162f698b68110eccd292467d81	104
131	87f0a7af8806c6d263b86bfde796ab4b	94
132	e5448c565a45c8fde1b430acdddef0dbb	88
133	5f219168f3260aa1c223b122a6e6d11e	87
134	6eece825b4e0f4a0378380c395a2e6b4	87
135	a82dcba4d3fba6bcdd3bbb209b70fc93	80
136	53ba4cef714818dc2281921efa9efae1	77
137	c4f0977c771c835b703637331853860e	71
138	8b5b85cad5c6744a0c25327c263f75a9	64
139	5432141d842320b74732c757e598168b	63
140	35fb282422a76d6d3c9573c025d6b5dd	62
141	d5d726340546001a186dee9e584e5206	48
142	347b76d983446186d046124e700ee5f3	44
143	be216fa40bba28fedb50b41c5c897fa0	38
144	0fbdff7e8d4bf380b348a0e0803628a4	33
145	930f55cb9beb75cbb9d46932b48bf2d9	32
146	b14d763c89057214c78c6cc4d66c90e7	32
147	228fc867f22b2e9748d9a6f64b3bb502	30
148	2fdc9e38619390db697c7a0e55a8e8ec	27
149	e317bdb07b2277d6f38b11cf2847d3bb	27
150	e022bcc682cb23ee1d5ec23cc2d2e642	23
151	84290e5ebf2db78c20e78769666a8bc5	21

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同日したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## 狭義のラビリンチュラ類

OUT #	OUT code	# of read
152	afeb5a012c84ec4c88a1ef02a89f68b0	21
153	fe5e6068e622bd103852be3788e61955	20
154	1e3c38650ceef171916e4ab299f907d3	19
155	f54a0835e96a4d52b8b3e55113dfa355	16
156	f7cdf2c59586003356ff11aa2f3570bd	16
157	c377e49ea7defcaa8f453291ce2efdbc	15
158	b022d677e43538295afe36c8e024d316	14
159	eab2f1aa1aafab4377ea77ebcabf7510	14
160	bd8dbbb6f1fea9151fad5b5909802b6c	13
161	788facf36c5eaa912341190a036dc4ed	12
162	7b1a1b8dc29cf4e3bf8d282b6dec0add	11
163	ea7e0fbef1eb69146cf2a36cf6767d6	11
164	15f9f04423419e623923acdbc2ac7473	10
165	ad4e6897084ca7172afbb3195863bade	10
166	17b576e03b681d00538e4c23c079074c	9
167	de008654a3231fc6753822ee634a1fa6	9
168	b1eb0b2abf33b7a4797ec09c7bd1d3f8	8
169	0cd78adfa4b1d40552b3258294c82852	7
170	2eb12d9e73c9c743e1fb8b0af91faddf	7
171	400eca555a6aac3d3b573873d4129a4f	7
172	8ffd6e2e184466d38a0a59f6228cadbe	7
173	af5c28866ba12699e24b684ff29b21d7	7
174	bedc05ab66c4357518ade80de202377c	7
175	2e78ebbf54b4ed94131e291eb8184952	6
176	56fbda71b1f00c698b5fb34f04b2859e	6
177	d647e22c19001a7e02c87aecab529c47	6
178	08ca241c7ee0b9e6a692c099f6ae9e36	5
179	30ec7d34beeb9dcd9ae4061bf46cd2f0	5
180	b77b7763bf7f6f108abf76adf052b3ce	5
181	ce36b94ac646863e5efa706d2ec4cc99	5
182	49752c0296cef63c93e59891a1dacc7f	4
183	4abff421370ba938ae6ddbbae0f4ea96e	4
184	9121c4979e950862cf009931b3b172fa	4
185	9d3e512bb2a7d0e49cbab1b6188f669f	4
186	17304bceac9c48c100ec5ebec1c84185	3
187	522decfee9792f80c2c1ab392fbefedb	3
188	6a312634e3382571514340be08845a45	3
189	8b21d8fa948eb450037afa06974c8151	3
190	9851f810f1b5386058ca6c54cbaca6ff	3
191	9f904d2773dd98609c915bae36303011	3
192	c202b4322985cbac009f4bea6bb72a0f	3
193	d60408ddc60b861955d2c4a64f8847d2	3
194	da21275586904767dd086a8638a399cc	3
195	fe2c5474f78915d5d8d2e94a20d25b18	3
196	74871db2bb08cd28925cfcbdc0e114a	2
197	81c926614a516cca004c57828b9032d4	2
198	5534b78f9f1e90d1a2e756fa3991da07	1
199	5ac79d7e7ff5e4ecabaf6ecda39302dc	1

表5-2.本研究でラビリントウ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## 狭義のヤブレッツボカビ類

OUT #	OUT code	# of read
200	26294f5e4628e4c0fca3f178da8c072d	5057
201	f21685ef9b790b07a2f30b8ee7b1a0f3	4530
202	0a5dd510964f46fb23a21da7f1fb8805	4104
203	8cdf9b02964933a64d5302bc7cc2ced2	3765
204	2ad10341bffd942240975ec138631035	1480
205	24c4aac3e9a4df4d59493b61f5079f87	1383
206	6ace4910bceb8de9cb633d8b38f802af	1258
207	cd6390e79303cf15bc0a8d10076e9627	1115
208	5e5dab6352a31f604a474b0df827ae66	917
209	aa4038c91c85e43ac89684f2dcb7c8b6	886
210	7136f3cec9cb5a8b7baa3e4ce8d1730c	804
211	1442449d02e004bf3e3e17007d35b29c	743
212	d21d64dff88db2a0c5999ca095f46d0e	741
213	2bd45d34e946524feff8e6101fa2d501	689
214	6e6102cf3173e36f8ce8ad338dd1eb49	657
215	956bf69b5499ea4da9207cf54a1d64c4	531
216	0ac956c966c39217b25085e9fa150e60	460
217	0c7084497edde2fd2b44cce92b07447e	389
218	e479e3ff527fd44c1a12af16a0fa8af0	329
219	efac8354d64af38ae5b698981e3076ba	317
220	bbd7bb2237db0576145549d075725ca5	311
221	ce15e72562b272ae14f71a6b1359cec4	309
222	cd65d99d0f60bac42e5ef8e348b554e6	278
223	7fcedae1d51b27ea843d1368912db27b	277
224	40bec14a1f2f39ecd94f9998d4537362	241
225	00fb3357eb0441cdd1e54c19e917daf1	223
226	2a40476a358ddcbcfefcff1cca178d36	213
227	9a62b71ac68a33e1afe12c60d77b8923	191
228	a87de179e0c31d9bc5dc526e66c56c3e	188
229	d62e2095fe8dff5049927d0b9c17ed3b	183
230	cbdeb2bb6b6ec92ed9f63a07331da237	179
231	9a99b618a516b9d68880697b58de2e8c	177
232	bcd2c47f7fa282bd8e1c1e49d31ccaa4	175
233	0b89bbd1fc642fe86251b5366d835415	174
234	306dfd946c7a53a39de1c06aef7e1e9	161
235	67d41fff32592ec5a19597d45bdc3c4a	155
236	282ef4a0bf90843336f8778b5cf5b1ee	142
237	a63898738247b4ffc93fd69fe18016f7	106
238	7c24390333831951073ad140c7f6a824	102
239	55dc61b290ae216af8d74461560730d1	101
240	6d7a62acbcf4aabe317a05b91e78c333	84
241	a6dcf2c25d92ce1790cd2d42124708cb	82
242	2c601f0ba97aa7b0eb0d0eb9003f979a	81
243	17a469f3c6ce1b0d6323d891f252aeab	79
244	bd9fcd968388d2005ae3eedc5de387ee	72
245	e0347448c702e04ee200c4074ee6a52f	68

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## 狭義のヤブレッツボカビ類

OUT #	OUT code	# of read
246	355f68a64d7f9ab83b6530f282aa8124	64
247	8550f4732b1efb4cefb4392469e428a3	63
248	9329832be86642566fd56ffeb151cd5f	55
249	3f573ed06f0c693799cd7d1af20486b2	52
250	06bf8cde5f6ab29e929fb141a16eb32a	51
251	3dc43adfd02ecfc780728967e361e8b2	49
252	c911080e2d16b7964ce90598d2cf0b23	35
253	03063b95d45f9247148b06e429208f7d	32
254	4db6c85271102e12ab84d973a58a958c	30
255	59159c8782196051707cdceddae1f171	30
256	e39dbd80302fdecb8f0e05da74fe7933	28
257	a8a0a6ff46bc23963aeb7db544958df1	27
258	c2905e0dfc38871c1c28a4de871c12e4	26
259	bd5c31a072560b9f64d88ad244726260	25
260	64fc6964f6ebae1a1077603095e51962	23
261	56ccee4a62b66c59a960b865ac78832e	22
262	6679a8cabb1992747e80ab8457930da9	19
263	fd31193897f456b3c2d87fb3bd8ddecc	18
264	6093e61f4291fad285b28bb9594b8e07	15
265	216275b3605d0325507387626ee14ae8	14
266	38b70e4e935fb2f94c62e415487b7b63	14
267	2cd155d681d618fc5cd3e282f160ec2b	13
268	d6690d7eccdc4133f93c297ba39dec32	13
269	6f3e3a30d0295c42dd34dc247da52866	12
270	2bf010eac293bea132777efaedfadd33	11
271	b6a69bf1a3ef5743b64b90f2666abb27	11
272	20dfc92addffe3a7b9902e33582bfa29	10
273	220e2b42c57b220b9baf1c25aec71367	10
274	274f53cc9853b636e17b78f07aa337c0	10
275	5bc93f63389065957de48d367a73774f	10
276	81f3a6e8e2d63ddc50e15d3dc12ec72a	10
277	e696e3ac85389d1f8fb1d8b900efb2c	10
278	f765c9fb6bfc171b3c43932c4187d2f8	10
279	2685737d5518272e46d2c93e7d29165e	9
280	3583d2dedc48e5df7070846b82f579b8	9
281	c5b83c2adcbd7295d46ea0807a44625	9
282	c8266d99083f42332ec5e293ea814a23	9
283	ce43a2d0aa00a1a2998eebcf90d72fe3	9
284	2fbcd860fa8777065b0b8dccc4e06607	8
285	44981815848c59279dfa58fbae1b56d	8
286	5fdf050d643cb9832c9cac717b0c4c84	8
287	960e329b247488e17b050f7819d3af87	8
288	b2158de2410e236c22dee84789023fc5	8
289	02d9d420997fb05bca066de981c273eb	7
290	0e3284c463b497396ac21f27f963cad1	7
291	7454b5a766973da8222e256e2d925c22	7

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

## 狭義のヤブレッツボカビ類

OUT #	OUT code	# of read
292	952205d58d0460c0f9852b37d6a8eafd	7
293	a3540c5d3780c042ee5584fd259925b4	7
294	87ab5b9cb3749b1b54b813059408eef5	6
295	9a2779ce17f5e83cd310e0c6087bca5f	6
296	bef8488549a5a9582035a0dc0ddf7737	6
297	da2d7f908e1f4dad4413dfa225e3268e	6
298	3e48576f56f13fc00fa74451b60b8ca8	5
299	3e61328489e786e9e85767351db0c1e9	5
300	6232e36d676f5ac5ead06b0c1545483	5
301	7a7d17c31fef2499b690513d826ef81a	5
302	bc372a29ec3be4dc90d5826b2abc6452	5
303	d26d849dc766b5a05ba5927376177136	5
304	04e8f8e48dd73fb4a8a4646d53524529	4
305	1283f0573f01d5b31d4a059e3fce082b	4
306	13ee9c93351e0a0f18c1d477225c4109	4
307	40c799f626f435eb9336cae6c231252e	4
308	67c5467620994f30239c8ca477299d76	4
309	b6be3c846ec003b6842ff13714224569	4
310	c624f4bd3eea28bb75b2776b04b4aeb3	4
311	d107dc310b00255801296312707de479	4
312	fb728a1b5cc79550016057e5111dbc92	4
313	fbf0de3e03b5a3e9af9f08c7f61084d5	4
314	034b3a01ce753a6b5077d5ba4d0e30e2	3
315	71c04b0e609817082860f0e0afe723c0	3
316	7ba6cefb929607d2be9ec5863c47eaa4	3
317	837fb45dae5fe73022e49da92d8afe3c	3
318	865e373a5a3562d4a0d43ec019862869	3
319	a0d8495b0da1939d9b75a4eb6034983a	3
320	b284b537e5f0a06e77ea887e50e3dc4d	3
321	ba0c81ca3445cc9045640f9b3fc44139	3
322	cae47611b83973230342edf09a4e8b41	3
323	e990191b928a55444649d39c20534d68	3
324	70efec7fd7df96541418f5a3f320cf94	2
325	a5dbf2b4aa8ab16dcf1362cc13b4daff	2
326	0c920aa401c1acdf564908e0ab47f73a	1

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(a) Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類

OUT #	OUT code	# of read
327	7fce6b15e0a3597a33580a339a4e2510	40342
328	5b91de13ee62b5812cd2d994738cb421	9259
329	affc5ab3f32df94b6de32808ff7d3dfb	4600
330	b27810161d5d9c509e15fb56e2ca3d03	3370
331	5092933412db8bb2d805e5bbad0cd73c	1845
332	3ffa8be3e6299c976466af643cd29736	1301
333	9c407c800629238c3f28e5d78229a537	492
334	c5591ba6cfd4eb533dc6b7e318c7be0	367
335	03be54cd2f9c52247845211b4fdf9af1	238
336	5cf871643bbd6fa93220af51d56d84cc	178
337	247fbc7ade72d69c64b335c2e569bc7d	78
338	9767c0f097f9a709c00cb20333994277	52
339	49f4f797f88d87a5da9946e612b1e8c0	33
340	bc2d8d7a2f7bff6f2e23e71fedff2073	26
341	13508454540d62b63732c9382d46767b	16
342	099f5a59508fa46e8708c441f9baf744	11
343	8a343bf5bad6a7c51dd5616802a4c425	6
344	bd90457e41be44426f91df5140fb41b8	4
345	f2440e21e1ec5a6f567e4574c75d4412	4
346	3f55850c19b128d120ee11e5e9376858	3
347	7c0886ee20cdc2e757878c4c048cd52c	3
348	aab8158023c06ee8fab349a09af00bfe	3
349	b1db039ef1775f5cc711574f8b2554ad	3
350	29114b9f1d5dc06b78c96b126c938040	2
351	c641ae534588ea8a1239fa5637b0890e	2

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

Amphifilidae group		
OUT #	OUT code	# of read
1	bd9fcd968388d2005ae3eedc5de387ee	72
2	216275b3605d0325507387626ee14ae8	14
3	6f3e3a30d0295c42dd34dc247da52866	12
4	5fdf050d643cb9832c9cac717b0c4c84	8
5	bc372a29ec3be4dc90d5826b2abc6452	5

Aplanochytrium		
OUT #	OUT code	# of read
6	4bdd337dc496d45cfd1f62f0cd51b8d1	58497
7	942f2796eaf505c0ef0bd03ca7da10a4	2916
8	45f243aa1b74378224828726523899b1	1239
9	6db17c966368eb25675bb5cc4706e605	1232
10	cd6390e79303cf15bc0a8d10076e9627	1115
11	805bf64c779619c75e161f17de75901e	478
12	962055636af95d80ae08dd1ba4ea360e	386
13	675324ab17b10b7ac11fa7698e490896	357
14	ce15e72562b272ae14f71a6b1359cec4	309
15	ea1607b0181b3181796d9d859024fc24	277
16	e2db29d2f18ca3678c8ee3420bd5cc16	239
17	9a62b71ac68a33e1afe12c60d77b8923	191
18	2b8e510c0b1034cc704d2baeb620546e	125
19	a8400533d62ee29bd87bc4e1d5123009	120
20	70c6d58dbe226b9648043ebe2cf17acb	118
21	67f0daa6d6fadb911f4949cf7f20d6f3	74
22	d5d726340546001a186dee9e584e5206	48
23	9127dfec0dde3bd91e248c833a5c9716	38
24	228fc867f22b2e9748d9a6f64b3bb502	30
25	60c67c1aee5f36f7e8a638d35d2f0886	27
26	fe5e6068e622bd103852be3788e61955	20
27	f980c4ed1550359a29c5c413bfc23c19	18
28	fd31193897f456b3c2d87fb3bd8ddecc	18
29	751e79dd4462a49a486d3ea4b0b253f7	12
30	dd60bd20c1aea11263ea40a65bf0b72	12
31	e68d515d76058ffb4c57a920f3d529c	12
32	274f53cc9853b636e17b78f07aa337c0	10
33	cc23c29e51d515db63f0e577131b8fad	9
34	982679211a910a1d4e4e080f7932aab3	8
35	e3b8f0c27eedfa4701af58d4a6eed93f	8
36	86864f712cd44a19603118ecfd2998f2	7
37	b7d1e2dcb79f3061d1a25e8ddbd72cd5	7
38	08ca241c7ee0b9e6a692c099f6ae9e36	5
39	b23e3f0f0a3f42e4ce99fcacc2c185ae	5
40	73f0937bae7e99a39fd4114584557b72	4

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同等したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

*Aplanochytrium*

OUT #	OUT code	# of read
41	c49e15bd13b324de6b75100220957c84	4
42	cfc43f1be533bd672ad6e021f19eafa6	4
43	1d1f20432346572a1385e68fe22763ee	3
44	5fe7964b6afb006149af09d0501baea9	3
45	608f16d278b2ca80bb9c4553f28452c1	3
46	c202b4322985cbac009f4bea6bb72a0f	3
47	496fcf3a63d99e662e56230ec7653edc	2
48	1c1bcdc4a786f9a335c41ad71385a3ad	1

*Aurantiochytrium*

OUT #	OUT code	# of read
49	24c4aac3e9a4df4d59493b61f5079f87	1383
50	5e5dab6352a31f604a474b0df827ae66	917
51	67d41fff32592ec5a19597d45bdc3c4a	155

*Botryochytrium*

OUT #	OUT code	# of read
52	a63898738247b4ffc93fd69fe18016f7	106
53	e696e3ac85389d1f8bf1d8b900efb2c	10
54	c624f4bd3eea28bb75b2776b04b4aeb3	4

*L. haliotidis* group

OUT #	OUT code	# of read
55	6ace4910bceb8de9cb633d8b38f802af	1258
56	7136f3cec9cb5a8b7baa3e4ce8d1730c	804
57	cd65d99d0f60bac42e5ef8e348b554e6	278
58	a87de179e0c31d9bc5dc526e66c56c3e	188
59	a6dcf2c25d92ce1790cd2d42124708cb	82
60	c2905e0dfc38871c1c28a4de871c12e4	26

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

## LAB1

OUT #	OUT code	# of read
61	c0a61cd47f4ec8515a128fc8ea071c2e	2037
62	1442449d02e004bf3e3e17007d35b29c	743
63	282ef4a0bf90843336f8778b5cf5b1ee	142
64	59159c8782196051707cdceddae1f171	30
65	fbf0de3e03b5a3e9af9f08c7f61084d5	4

## LAB4

OUT #	OUT code	# of read
66	956bf69b5499ea4da9207cf54a1d64c4	531
67	1987cef92ab9c78f2d95b69f82d8e0b9	173
68	bceccd928e1f78fb949a52187792c54e	104
69	9aa288360d4808b5be9adf0fd3c1f5b9	81
70	a82dcba4d3fba6bccd3bbb209b70fc93	80
71	4ff215d9703ffe03ffeda797a1c864a6	23
72	84290e5ebf2db78c20e78769666a8bc5	21
73	f54a0835e96a4d52b8b3e55113dfa355	16
74	634bf915c98e17a80ac8ac86c74a9057	11
75	1f083c7da57aa74567d70af7af45a009	4
76	9f9fd2706aa7d02d717e49728e83f379	4
77	1618798f865a8a56817b36a4213a85f9	3
78	3957d6a1fbcc1240159f7ddc37024090	3
79	7b27093121b182e1a5531581a7f304e6	3
80	0c920aa401c1acdf564908e0ab47f73a	1

## LAB6

OUT #	OUT code	# of read
81	6e6102cf3173e36f8ce8ad338dd1eb49	657
82	35fb282422a76d6d3c9573c025d6b5dd	62
83	2eb12d9e73c9c743e1fb8b0af91faddf	7
84	9a2779ce17f5e83cd310e0c6087bca5f	6
85	bef8488549a5a9582035a0dc0ddf7737	6
86	6232e36d676f5ac5eaad06b0c1545483	5
87	7a7d17c31fef2499b690513d826ef81a	5
88	13ee9c93351e0a0f18c1d477225c4109	4
89	40c799f626f435eb9336cae6c231252e	4
90	fb728a1b5cc79550016057e5111dbc92	4
91	a5dbf2b4aa8ab16dcf1362cc13b4daff	2

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

LAB7

OUT #	OUT code	# of read
92	a17905132d3331696d69a6eec215b165	33670
93	0e1868375a02a9fc540f85bb6b80505c	26278
94	264b99017913aec3e7160a25b071aa71	22018
95	26294f5e4628e4c0fca3f178da8c072d	5057
96	8cdf9b02964933a64d5302bc7cc2ced2	3765
97	338a28778065fe0657e66e8153ca0dd8	692
98	1211ceba4f9a57ebc9e45854c20b1b6d	331
99	5bc4cd01621b4b9231f1b148732a8dc7	236
100	ed2c863bf4bbad1afffb4935233ec363	219
101	da7d67354de72a8bda1fc5aa4c20c815	209
102	69c33b6162f698b68110ecd292467d81	104
103	e5448c565a45c8fde1b430acddef0dbb	88
104	247fbc7ade72d69c64b335c2e569bc7d	78
105	53ba4cef714818dc2281921efa9efae1	77
106	347b76d983446186d046124e700ee5f3	44
107	e7be89637e3bf5aaaa47b9426e7d4ed1	28
108	e022bcc682cb23ee1d5ec23cc2d2e642	23
109	1e3c38650ceef171916e4ab299f907d3	19
110	29add138cdb5b8c01dd63a5c6247f8e7	19
111	a0bde2b89286e7125b5585cad4282aa	19
112	f0311a7af3a016256e6e3236f4b7f050	17
113	c377e49ea7defcaa8f453291ce2efdbc	15
114	b9fe46271e5369aaa215b836db8059e1	12
115	de008654a3231fc6753822ee634a1fa6	9
116	af5c28866ba12699e24b684ff29b21d7	7
117	d647e22c19001a7e02c87aecab529c47	6
118	3f79fb94bf9b55ede32ce12304294ecd	5
119	ce36b94ac646863e5efa706d2ec4cc99	5
120	6aca984d2cc5d36318dcbc812f1b99f4	3
121	7942f1d88381bdfbdebe99a10561bc73	3
122	9851f810f1b5386058ca6c54cbaca6ff	3
123	c2f17c2fa57e5dd4200541449d823cc9	3
124	c6e45ccf913e289d8c6edbbec968bd71	3
125	cceaf6f4244957c852268e719756b011	3
126	81c926614a516cca004c57828b9032d4	2

LAB8

OUT #	OUT code	# of read
127	0c7084497edde2fd2b44cce92b07447e	389
128	e39dbd80302fdecb8f0e05da74fe7933	28
129	d26d849dc766b5a05ba5927376177136	5

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

## LAB15

OUT #	OUT code	# of read
130	7fce6b15e0a3597a33580a339a4e2510	40342
131	5b91de13ee62b5812cd2d994738cb421	9259
132	affc5ab3f32df94b6de32808ff7d3dfb	4600
133	b27810161d5d9c509e15fb56e2ca3d03	3370
134	9c407c800629238c3f28e5d78229a537	492
135	c5591ba6cfd4eb533dc6b7e318c7be0	367
136	289ae5ecd612791883395622131b37e	216
137	5cf871643bbd6fa93220af51d56d84cc	178
138	9767c0f097f9a709c00cb20333994277	52
139	bc2d8d7a2f7bff6f2e23e71fedff2073	26
140	099f5a59508fa46e8708c441f9baf744	11
141	ea7e0fbef1eb69146cf2a36cf6767d6	11
142	8a343bf5bad6a7c51dd5616802a4c425	6
143	9d3e512bb2a7d0e49cbab1b6188f669f	4
144	bd90457e41be44426f91df5140fb41b8	4
145	3f55850c19b128d120ee11e5e9376858	3
146	7c0886ee20cdc2e757878c4c048cd52c	3
147	b1db039ef1775f5cc711574f8b2554ad	3
148	29114b9f1d5dc06b78c96b126c938040	2
149	c641ae534588ea8a1239fa5637b0890e	2

## LAB17

OUT #	OUT code	# of read
150	d3e1bbe4c5a6906e7794e528abdd40e	12083
151	f21685ef9b790b07a2f30b8ee7b1a0f3	4530
152	8a849dbbb3a48634e74e00b509617dcc	3254
153	55dc61b290ae216af8d74461560730d1	101
154	4db6c85271102e12ab84d973a58a958c	30
155	ce43a2d0aa00a1a2998eebcf90d72fe3	9
156	04e8f8e48dd73fb4a8a4646d53524529	4
157	d107dc310b00255801296312707de479	4
158	034b3a01ce753a6b5077d5ba4d0e30e2	3
159	6a312634e3382571514340be08845a45	3

## LAB20

OUT #	OUT code	# of read
161	930f55cb9beb75cbb9d46932b48bf2d9	32
162	74871db2bb08cd28925cfcbdc0e114a	2
163	5ac79d7e7ff5e4ecabaf6ecda39302dc	1

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

<i>Labyrinthula</i>		
OUT #	OUT code	# of read
164	f0e927105b237e2194dd04db415729da	1110
165	c4f0977c771c835b703637331853860e	71
166	be216fa40bba28fedb50b41c5c897fa0	38
167	eab2f1aa1aafab4377ea77ebcabf7510	14
168	d6690d7eccdc4133f93c297ba39dec32	13
169	788facf36c5eaa912341190a036dc4ed	12
170	2bf010eac293bea132777efaedfadd33	11
171	220e2b42c57b220b9baf1c25aec71367	10
172	ad4e6897084ca7172afbb3195863bade	10
173	17b576e03b681d00538e4c23c079074c	9
174	2fbed860fa8777065b0b8dccc4e06607	8
175	44981815848c59279dfa58fbae1b56d	8
176	02d9d420997fb05bca066de981c273eb	7
177	0cd78adfa4b1d40552b3258294c82852	7
178	0e3284c463b497396ac21f27f963cad1	7
179	8ffd6e2e184466d38a0a59f6228cadbe	7
180	a3540c5d3780c042ee5584fd259925b4	7
181	bedc05ab66c4357518ade80de202377c	7
182	56fbda71b1f00c698b5fb34f04b2859e	6
183	3e61328489e786e9e85767351db0c1e9	5
184	49752c0296cef63c93e59891a1dacc7f	4
185	9121c4979e950862cf009931b3b172fa	4
186	17304bceac9c48c100ec5ebec1c84185	3
187	837fb45dae5fe73022e49da92d8afe3c	3
188	9f904d2773dd98609c915bae36303011	3
189	b284b537e5f0a06e77ea887e50e3dc4d	3
190	ba0c81ca3445cc9045640f9b3fc44139	3
191	cae47611b83973230342edf09a4e8b41	3
192	d60408ddc60b861955d2c4a64f8847d2	3
193	da21275586904767dd086a8638a399cc	3

表5-2.本研究でラビリントチュラ類と同等したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

Labyrinthulida ANT10_3		
OUT #	OUT code	# of read
194	ed77a91dca6408bedfdbcb6805e1f3bc3	10822
195	a7607486fb7d05b4edf332c228a5b74a	8483
196	bedcd7f6edb5ef006a5dcec216b61684	8169
197	0a5dd510964f46fb23a21da7f1fb8805	4104
198	6f17f30cc973169296b137122835dfcb	2461
199	5092933412db8bb2d805e5bbad0cd73c	1845
200	2ad10341bff942240975ec138631035	1480
201	3ffa8be3e6299c976466af643cd29736	1301
202	1ff80d085fd6b76bc4fd9ae683b2838f	1252
203	72e2c282f089af75298a19e78a99ee76	833
204	d21d64dff88db2a0c5999ca095f46d0e	741
205	2bd45d34e946524feff8e6101fa2d501	689
206	e6abbec2c843054bea7762f48e8d444e	407
207	78d823d2d81ae3251e72d9f4ba360c62	357
208	efd98c9e0af5b20e281b46b2bba2b596	291
209	d71cf53db823f269b7aa3a605395eaa8	268
210	051ccbc9d546bae7505e0d05eccb3c16	248
211	03be54cd2f9c52247845211b4fdf9af1	238
212	00fb3357eb0441cdd1e54c19e917daf1	223
213	cbdeb2bb6b6ec92ed9f63a07331da237	179
214	c8824a94780fcfad10667e4860808810	142
215	fded7939edd5fcd5044d1a1c54323ba7	128
216	44fa63447a971cad23515284a4f6b887	112
217	72bc078fcd56964d69479cf05f011317	100
218	5f219168f3260aa1c223b122a6e6d11e	87
219	6eece825b4e0f4a0378380c395a2e6b4	87
220	e0347448c702e04ee200c4074ee6a52f	68
221	8b5b85cad5c6744a0c25327c263f75a9	64
222	5432141d842320b74732c757e598168b	63
223	8550f4732b1efb4cefb392469e428a3	63
224	3dc43adfd02ecfc780728967e361e8b2	49
225	0fbdff7e8d4bf380b348a0e0803628a4	33
226	03063b95d45f9247148b06e429208f7d	32
227	2fdc9e38619390db697c7a0e55a8e8ec	27
228	a8a0a6ff46bc23963aeb7db544958df1	27
229	9884306e46612502c6228cc4d126b914	23
230	afeb5a012c84ec4c88a1ef02a89f68b0	21
231	08c3c5adfbbb14e9bf1819465d2e3453	17
232	5b6fa9ab4d87e485c94b7e06c51900e2	15
233	1cf040143d2601123731ec130801d1ff	14
234	b022d677e43538295afe36c8e024d316	14

表5-2.本研究でラビリントラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

Labyrinthulida ANT10_3		
OUT #	OUT code	# of read
235	bcbf8f41ab6bd611ab4d25fc14114b	13
236	15f9f04423419e623923acdbc2ac7473	10
237	f765c9fb6bfc171b3c43932c4187d2f8	10
238	c5b83c2adcbd7295d46ea0807a44625	9
239	0ad9e32d01ddc60dfcd57d4e9116d6ce	7
240	952205d58d0460c0f9852b37d6a8eafd	7
241	0258763ddb7c5f72409234f8362f5f0	6
242	2e78ebbf54b4ed94131e291eb8184952	6
243	da2d7f908e1f4dad4413dfa225e3268e	6
244	30ec7d34beeb9dcd9ae4061bf46cd2f0	5
245	50c8dd31a46b56821889968cc8ec002b	5
246	b3075691009b51e1c4efd621d21afc7c	5
247	c4336e625cfb0080be64e8103ee912e2	5
248	d0d6b9c699e9e87f27cbcb495b05e061	5
249	e9ee8df9254e7e6ba5d91b8e63a3864a	5
250	3085443d7ceee391ec3bbfc22edbbade	4
251	3424673363b30d95cab284c229352a67	3
252	8b21d8fa948eb450037afa06974c8151	3
253	986fa4e19e0b1edc10222fd65bc7049b	3
254	e990191b928a55444649d39c20534d68	3

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

<i>Oblongichytrium</i>		
OUT #	OUT code	# of read
255	358eca818ab8d85290d9ae4003e5086a	7661
256	f513214b061518e07b3c25ffb135af4d	2653
257	ed94b9b25767a068ffe0bf91f36207b6	1918
258	e75485294619fd885c8e48be0caec93f	533
259	a8cb5bbd976961b73affaf50c6efe33	500
260	b9a2c6a6391be79300b6b89281be2dae	287
261	2a40476a358ddcbcfecff1cca178d36	213
262	1f658b5910bc5fb6bf54270e882f1c8c	211
263	f3746150301cdac46b6c496e50bd7386	203
264	a2b282ff32610de026a7d9d5cd53c8b9	183
265	bcd2c47f7fa282bd8e1c1e49d31ccaa4	175
266	a9eccdc8c856a80f45d25ab67cef65ed4	162
267	d672245b2601f5201513bdfac86aa117	111
268	87f0a7af8806c6d263b86bfde796ab4b	94
269	17a469f3c6ce1b0d6323d891f252aeab	79
270	bd8d2b26d56b17fb8a2b068b8228cee5	61
271	b4467ceacda741ca130dde56302caa7b	48
272	b14d763c89057214c78c6cc4d66c90e7	32
273	e317bdb07b2277d6f38b11cf2847d3bb	27
274	558b0b95520fc8acbfab2e2d91add871	21
275	f7cdf2c59586003356ff11aa2f3570bd	16
276	bd8dbbb6f1fea9151fad5b5909802b6c	13
277	a7a087f8e89374eedbc67516528512bf	10
278	5cc9b8571c28c668ae28d2876724f053	8
279	b1eb0b2abf33b7a4797ec09c7bd1d3f8	8
280	400eca555a6aac3d3b573873d4129a4f	7
281	7d567fa706e81bd68a2741639b79ed44	7
282	2332821f6297a6866bae2b5844074a75	6
283	7d340630552cd7464a51e8a495b7cdbd	6
284	be17c93cf1acd5f50ec261c2bf1552c	6
285	570facf3eb2ed66b3c26dbef4cfc2f85	5
286	b77b7763bf7f6f108abf76adf052b3ce	5
287	4a561ae9ef865304c18cdd8fe4991213	4
288	4abff421370ba938ae6ddbbae0f4ea96e	4
289	84e8ea9092c35b4143ffb3ea77eaa603	4
290	bd9395ff3879751cd074a60694bb09e3	4
291	f9a8a81f66870d0616a1566256ae95ef	4
292	7c11beedd1493d4b45a24881dff67b47	3
293	9ecd6060d836de6a04c438c93eaf270a	3
294	f2de9883cf5a01373c4be70c6873fe37	3
295	38c4dfc755cc4a3cdd94e941cedbd246	2
296	5534b78f9f1e90d1a2e756fa3991da07	1
297	7542f5d7334d1ca30b0163d8c4d0d25a	1

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同等したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

*Parietichytrium*

OUT #	OUT code	# of read
298	aab8158023c06ee8fab349a09af00bfe	3

## Quahog parasite group

OUT #	OUT code	# of read
299	aa4038c91c85e43ac89684f2dcb7c8b6	886
300	40bec14a1f2f39ecd94f9998d4537362	241
301	355f68a64d7f9ab83b6530f282aa8124	64
302	3f573ed06f0c693799cd7d1af20486b2	52
303	6679a8cabb1992747e80ab8457930da9	19
304	38b70e4e935fb2f94c62e415487b7b63	14
305	2cd155d681d618fc5cd3e282f160ec2b	13
306	5bc93f63389065957de48d367a73774f	10
307	c8266d99083f42332ec5e293ea814a23	9
308	960e329b247488e17b050f7819d3af87	8
309	87ab5b9cb3749b1b54b813059408eef5	6
310	865e373a5a3562d4a0d43ec019862869	3

*Sicyoidochytrium*

OUT #	OUT code	# of read
311	7c24390333831951073ad140c7f6a824	102
312	9329832be86642566fd56ffeb151cd5f	55
313	81f3a6e8e2d63ddc50e15d3dc12ec72a	10

*T. aureum* group

OUT #	OUT code	# of read
314	0ac956c966c39217b25085e9fa150e60	460
315	522decfee9792f80c2c1ab392fbefedb	3
316	70efec7fd7df96541418f5a3f320cf94	2

*T. kinnei* group

OUT #	OUT code	# of read
317	0b89bbd1fc642fe86251b5366d835415	174
318	306df1d946c7a53a39de1c06aef7e1e9	161
319	6d7a62acbcf4aabe317a05b91e78c333	84
320	71c04b0e609817082860f0e0afe723c0	3

表5-2.本研究でラビリンチュラ類と同一したTARA OCEANSのOTUs (続き)

(b) Pan et al. (2017) に基づいた分類

<i>T. striatum</i> group		
OUT #	OUT code	# of read
321	49f4f797f88d87a5da9946e612b1e8c0	33
322	13508454540d62b63732c9382d46767b	16
323	f2440e21e1ec5a6f567e4574c75d4412	4
324	7ba6cefb929607d2be9ec5863c47eaa4	3

Thraustochytriidae HK10		
OUT #	OUT code	# of read
325	4c5b892187c4f5e077d25122484fcf9c	584
326	e479e3ff527fd44c1a12af16a0fa8af0	329
327	efac8354d64af38ae5b698981e3076ba	317
328	bbd7bb2237db0576145549d075725ca5	311
329	7fcedae1d51b27ea843d1368912db27b	277
330	9a99b618a516b9d68880697b58de2e8c	177
331	2c601f0ba97aa7b0eb0d0eb9003f979a	81
332	06bf8cde5f6ab29e929fb141a16eb32a	51
333	c911080e2d16b7964ce90598d2cf0b23	35
334	64fc6964f6ebae1a1077603095e51962	23
335	6093e61f4291fad285b28bb9594b8e07	15
336	7b1a1b8dc29cf4e3bf8d282b6dec0add	11
337	b6a69bf1a3ef5743b64b90f2666abb27	11
338	20dfc92addffe3a7b9902e33582bfa29	10
339	b2158de2410e236c22dee84789023fc5	8
340	7454b5a766973da8222e256e2d925c22	7
341	67c5467620994f30239c8ca477299d76	4
342	b6be3c846ec003b6842ff13714224569	4
343	a0d8495b0da1939d9b75a4eb6034983a	3
344	fe2c5474f78915d5d8d2e94a20d25b18	3

<i>Ulkenia</i>		
OUT #	OUT code	# of read
345	d62e2095fe8dff5049927d0b9c17ed3b	183
346	bd5c31a072560b9f64d88ad244726260	25
347	2685737d5518272e46d2c93e7d29165e	9
348	1283f0573f01d5b31d4a059e3fce082b	4

該当なし		
OUT #	OUT code	# of read
349	56ccee4a62b66c59a960b865ac78832e	22
350	3583d2dedc48e5df7070846b82f579b8	9
351	3e48576f56f13fc00fa74451b60b8ca8	5

表5-3.

Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類とPan et al. (2017) に基づいた分類の対応表

Pan et al. (2017) の各分類群には複数のOTUsが含まれており、各OTUは、Ueda et al. (2015) およびHonda et al. (1999) に基づいて系統解析をした結果、異なるグループに入ることがあった。

	Ueda et al. (2015) , Honda et al. (1999) に基づいた分類									
	TARA OCEANS					大阪湾				
	Th	La	Ap	Ob	外群	Th	La	Ap	Ob	外群
Amphifilidae group	○					○				
<i>Aplanochytrium</i>	○	○	○					○		
<i>Aurantiochytrium</i>	○					○				
<i>Botryochytrium</i>	○									
<i>L. haliotidis</i> group	○									
LAB1	○	○				○				
LAB2			○			○			○	
LAB20		○				-	-	-	-	-
LAB4	○	○		○					○	○不明
LAB5	-	-	-	-	-	○			○	
LAB6	○	○								
LAB7	○	○	○	○	○	○			○	
LAB8	○					○				
LAB9	-	-	-	-	-	○				
LAB10	-	-	-	-	-				○	
LAB14	-	-	-	-	-				○	
LAB15		○			○					○不明
LAB17	○	○				○				
<i>Labyrinthula</i>	○	○				-	-	-	-	-
Labyrinthulida ANT10_3	○	○	○	○	○			○		
<i>Oblongichytrium</i>	○	○	○	○		○			○	
<i>Parietichytrium</i>						-	-	-	-	-
Quahog parasite group	○					-	-	-	-	-
<i>Sicyoidochytrium</i>	○					-	-	-	-	-
<i>T. aureum</i> group	○	○				-	-	-	-	-
<i>T. kinnei</i> group	○					-	-	-	-	-
<i>T. striatum</i> group	○					-	-	-	-	-
Thraustochytriidae	-	-	-	-	-	○				
Thraustochytriidae HK10	○	○				-	-	-	-	-
Thraustochytriidae SEK690	-	-	-	-	-	○				
<i>Ulkenia</i>	○					○				

Th : thraustochytrids, La : labyrinthulids, Ap : aplanochytrids, Ob : oblongichytrids



## 第6章

### 総合考察

*Aplanochytrium*を中心とした経路が海洋生態系に与える影響

本章では、培養実験の結果からラビリンチュラ類が関与する海洋生態系における役割を整理した。さらに、推定された細胞密度をもとに年間の  $1 \text{ m}^2$  あたりの生産量（生産速度）を推定し、海洋生態系においてラビリンチュラ類が与える影響力について、総合的に考察した。

*Aplanochytrium* が植物プランクトンから栄養を摂取すること、また、*Aplanochytrium* を含むラビリンチュラ類が動物プランクトンに捕食されることが、植物プランクトンと動物プランクトンの生産量にどれほどの影響を与えているかを評価した。

まず、先行研究として、瀬戸内海における炭素循環を推定するために 1993 年から 1994 年にかけて行われた大規模な現存量調査の結果が報告されている。植物プランクトン、微小動物プランクトン、植物食性動物プランクトン、動物食性動物プランクトンからなる生食連鎖と、バクテリアと従属栄養性鞭毛藻類からなる微生物ループが存在していると推測され、植物プランクトンの生産速度は  $285.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ 、微小動物プランクトンは  $29.2 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ 、植物食性動物プランクトンは  $51.8 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ 、バクテリアの生産速度は  $800.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と推定された（Uye et al. 1996, Hashimoto et al. 1997, Naganuma and Miura 1997, Uye and Shimazu 1997；図 6-1）。さらに、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンの転送効率は、それぞれ 40%、30%と推定されていることから（Ikeda and Motoda 1978）、微小動物プランクトンが消費する炭素は  $72.9 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ 、植物食性動物プランクトンが消費する炭素は  $172.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  であると推定された（Uye et al. 1996；図 6-1，式-1，式-2）。つまり、植物プランクトンが生産する炭素の  $244.9 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ （85.9%）が微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンに消費されており（図 6-1，式-3，式-4）、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンが消費した残りの  $40.1 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ （14.1%）（図 6-1，式-5，式-6）はバクテリアを支える炭素としては少ないことが明らかになった（Cole et al. 1988, Uye and Shimazu 1997）。なお、この調査では、微生物ループを構成する生物群である従属栄養性鞭毛藻類の現存量が推定されていない。そこで、相模湾におけるプランクトンの現存量調査に関する報告をもとに、従属栄養性鞭毛藻類の生産速度を仮定した（Ara and Hiromi 2009）。相模湾の植物プランクトンの生産速度は  $281.5 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と推定されており、瀬戸内海とほぼ同程度であるといえる。そこで、瀬戸内海と相模湾の従属栄養性鞭毛藻類の生産速度は同程度と判断し、本研究の試算では、瀬戸内海の従属栄養性鞭毛藻類の生産速度を  $29.8 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と仮定した。

その上で、ラビリンチュラ類が炭素循環にどれほどの影響を与えているかを評価するため、まず、*Aplanochytrium* と *Aplanochytrium* 以外のラビリンチュラ類が、それぞれ何から栄養を摂取し、何に捕食されているかを考察した。本研究では、*Aplanochytrium* が珪藻から栄養摂取の様子を観察し、栄養摂取の過程で集合体を形成する様子を観察した（第 3 章 参照）。さらに、珪藻以外のプラシノ藻やハプト藻から栄養摂取し、集合体を形成することが確認されている

(2018年度 甲南大学 卒業研究生 茂木 大地氏 私信)。いずれの藻類の場合も、形成された集合体の大きさは  $10\sim 1\times 10^3 \mu\text{m}$  であった。一般的に被食者と捕食者の大きさの比が 1:10 であることを考慮すると (Azam et al. 1983), 形成された集合体は  $1\times 10^2\sim 1\times 10^4 \mu\text{m}$  の大きさの動物プランクトンが捕食できる大きさである。実際、次世代シーケンサー解析による *Calanus sinicus* の食性解析の結果、*C. sinicus* の消化管内容物から *Aplanochytrium* が検出され、*Aplanochytrium* を主要な餌のひとつとしている可能性が示された (Hirai et al. 2018)。以上のことから、*Aplanochytrium* は、植物プランクトンから栄養を摂取し、微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンに捕食されるという経路が存在することが強く示唆された。一方のラビリンチュラ類は、陸起源有機物を分解していると推測されている (Kimura and Naganuma 2001, Kimura et al. 2001, Ueda et al. 2015, )。前述の *C. sinicus* の食性解析では、*C. sinicus* の消化管内容物から *Aplanochytrium* 以外のラビリンチュラ類は検出されなかったことから、*Aplanochytrium* 以外のラビリンチュラ類は植物食性動物プランクトンに捕食される頻度が低いと考えられた。このことから、*Aplanochytrium* 以外のラビリンチュラ類は、陸起源有機物を分解し、微小動物プランクトンに捕食されるという経路が想定された。

次に、生物が消費する炭素に関して以下のような仮説を立てた。淡水では、微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンのうち、生産された炭素のうち 10% は消費されていないと報告されている (Grami et al. 2011)。さらに、前述した “*If both herbivorous net-zooplankton and microzooplankton depended entirely on phytoplankton as food, their carbon requirement would be equal to 86% of the primary production. In this case, the remaining (14%) primary production was apparently too small to support the normal bacterial production, which averages 20–60% of the primary production.* (植物食性動物プランクトンと微小動物プランクトンが植物プランクトンのみを捕食していると仮定すると、2つの生物群が必要とする炭素量は、一次生産量の 86% に相当する。この場合、残りの一次生産量 (14%) は、一次生産量の平均 20~60% であるバクテリアの生産量を支えるには不足している。)” (Uye and Shimazu 1997) という問題を理解するために、微小動物プランクトンは植物プランクトンと従属栄養性鞭毛藻類を、また植物食性動物プランクトンは植物プランクトンと微小動物プランクトンを捕食していると推測されている (Uye and Shimazu 1997)。消費者は植物プランクトンを食べる植物食性動物プランクトン (一次消費者)、植物食性動物プランクトンを食べる動物食性動物プランクトン (二次消費者)、さらに動物食性動物プランクトンを食物にする魚類 (三次消費者) で構成されており、生物は互いに「食べる、食べられる」の関係で鎖のようにつながっているため、食物連鎖という。しかし、実際には多くの生物の「食べる、食べられる」の関係は 1本の鎖ではなく、網の目のようにつながっている。Uye and Shimazu (1997) は、食物連鎖ではなく食物網 [food web] の考え方を適用したといえる。

本研究でも、生産された炭素のうち 10%が消費されないという報告と食物網の考え方を適用し、さらに、以下のような仮説を立てた。生物は複数種の生物を捕食し、複数種の生物に捕食される。そのため、低次栄養段階の消費者 (a) は複数の高次栄養段階の消費者 (X と Y) に消費される生態系を想定しなければならない (図 6-2)。ここでは、X と Y が消費するそれぞれの炭素の比と、a が生産し X と Y に供給する炭素の比が同じと仮定した。例えば、それぞれ 100 g C/m<sup>2</sup>/yr, 50 g C/m<sup>2</sup>/yr の炭素を消費する X と Y, 50 g C/m<sup>2</sup>/yr の炭素を生産する a が存在する場合について考える。a は、50 g C/m<sup>2</sup>/yr の炭素を生産し、90%に相当する 45 g C/m<sup>2</sup>/yr は X と Y に 100 : 50 の比で炭素を供給される。つまり、a は、X と Y に、それぞれ 30 g C/m<sup>2</sup>/yr と 15 g C/m<sup>2</sup>/yr の炭素を供給する。また、X と Y が消費する残りの 70 g C/m<sup>2</sup>/yr と 35 g C/m<sup>2</sup>/yr の炭素は、他の低次栄養段階の消費者 (b と c) が供給すると想定した。

瀬戸内海で示されている炭素循環に、上述の 2 つの仮説を適用した。生産された炭素のうち 90%が消費されると仮定したので、従属栄養性鞭毛虫が生産する炭素のうち 26.8 g C/m<sup>2</sup>/yr が高次栄養段階の消費者に消費されると推測される (図 6-3, 式-7, 式-8)。従属栄養性鞭毛藻類は微小動物プランクトンに捕食されると考えられるので、従属栄養性鞭毛藻類が生産する炭素 (26.8 g C/m<sup>2</sup>/yr) はすべて微小動物プランクトンに消費されると想定した。同様に、微小動物プランクトンが生産する炭素のうち 26.3 g C/m<sup>2</sup>/yr が高次栄養段階の消費者に消費されると推測される (図 6-3, 式-9, 式-10)。微小動物プランクトンは植物食性動物プランクトンと動物食性動物プランクトンに捕食されると考えられる。ここでは、高次栄養段階の消費者 (X と Y) が消費するそれぞれの炭素の比と低次栄養段階の消費者 (a) が生産し X と Y に供給する炭素の比が同じと仮定したので、微小動物プランクトンは、植物食性動物プランクトンと動物食性動物プランクトンにそれぞれ 19.0 g C/m<sup>2</sup>/yr, 7.3 g C/m<sup>2</sup>/yr を供給していると推定された (図 6-3, 式-11)。

この炭素循環の図式に瀬戸内海における炭素循環に *Aplanochytrium* とラビリンチュラ類を中心とした新しい経路を加え、*Aplanochytrium* が瀬戸内海における海洋生態系に与える影響を考察した。

まず、湾中央を対象として考察を行った。湾中央に生息する *Aplanochytrium* 系統群と *Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の生産速度を推定した。湾中央の *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度 (表層は 2,900 cells/L, 底層は 1,400 cells/L) から生産速度を算出した結果、およそ 5.0 g C/m<sup>2</sup>/yr と推定された (第 4 章 参照)。本研究では、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の細胞密度は定量していない。微生物の群集構造を把握するために行った次世代シーケンサー解析の結果から、ラビリンチュラ類全体のリード数のうち、*Aplanochytrium* 系統群は 65%、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュ

ラ類は 35%であった (第 5 章 参照)。系統群ごとに 1 細胞あたりの rDNA コピー数に差があり、同じ生物群でも属や種によって差がある (Prokopowich et al. 2003, Zhu et al. 2005, Godhe et al. 2008, Gong et al. 2013, Hariganeya et al. 2013)。そのため、18S rDNA コピー数をそのまま細胞数に換算することはできないが、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の生産速度は、ラビリンチュラ類全体の 35%であると仮定し、 $2.7 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と概算した。

前述したように、*Aplanochytrium* は植物プランクトンから栄養を摂取するという経路が想定された。これまでに、*Aplanochytrium* の転送効率は測定されていない。そこで、*Aplanochytrium* と同様に植物プランクトンが生産する炭素を消費する微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンの転送効率が、それぞれ 40%と 30%であることを考慮に入れ (Ikeda and Motoda 1978)、*Aplanochytrium* の転送効率を 40%と仮定した (Uye and Shimazu 1997)。この場合、*Aplanochytrium* は植物プランクトンが生産する炭素  $12.5 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を消費する (図 6-4, 式-12)。また、*Aplanochytrium* は植物食性動物プランクトンや動物食性動物プランクトンに捕食されているという経路が想定された。*Aplanochytrium* 系統群の生産速度は  $5.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  であり、生産された炭素のうち 90%が消費されると仮定しているので、*Aplanochytrium* 系統群が生産する炭素のうち  $4.5 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  が高次栄養段階の消費者に消費されると推測される (図 6-4, 式-13, 式-14)。高次栄養段階の消費者 (X と Y) が消費するそれぞれの炭素の比と、低次栄養段階の消費者 (a) が生産し X と Y に供給する炭素の比が同じと仮定したので、*Aplanochytrium* 系統群は、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンにそれぞれ  $1.34 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $3.16 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を供給していると推定された (図 6-4, 式-15)。次に、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類について考察した。前述したように、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の生産速度は  $2.7 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  であり、微小動物プランクトンに捕食されているという経路が想定された。生産された炭素のうち 90%が消費されると仮定しているので、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類が生産する炭素のうち  $2.43 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  すべてが微小動物プランクトンに消費されると推測される (図 6-5, 式-16, 式-17)。よって、植物プランクトンを捕食する生物である微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンは、植物プランクトンが生産する炭素のうちそれぞれ、 $42.3 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $149.8 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を消費していると推定された (図 6-5, 式-18, 式-19)。

同様に、湾奥に生息するラビリンチュラ類について、炭素循環とエネルギーの流れを推定した。湾奥の *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度 (表層は 17,000 cells/L, 底層は 9,200 cells/L) から生産速度を算出した結果、およそ  $17.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と推定された (第 4 章 参照)。また、次世代シーケンサー解析の結果から、ラビリンチュラ類全体のリード数のうち、

*Aplanochytrium* 系統群は 58%, *Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類は 42%であった (第 5 章 参照)。*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の生産速度は、ラビリンチュラ類全体の 42%であると仮定し、 $12.3 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と概算した。よって、*Aplanochytrium* 系統群は、植物プランクトンが生産する炭素  $42.5 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を消費し、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンにそれぞれ  $4.55 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $10.75 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を供給していると推定された (図 6-6, 式-20, 式-21, 式-22, 式-23)。また、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類は、微小動物プランクトンに  $11.1 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を供給していると推定された (図 6-6, 式-24, 式-25)。よって、植物プランクトンを捕食する生物である微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンは、植物プランクトンが生産する炭素のうちそれぞれ、 $30.45 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $142.25 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を消費していると推測された (図 6-6, 式-26, 式-27)。

以上のように、*Aplanochytrium* が植物プランクトンから栄養摂取し、植物食性動物プランクトンと動物食性動物プランクトンに捕食されているという経路を想定し、植物プランクトン、植物食性動物プランクトン、動物食性動物プランクトンの生産量にどれほどの影響を与えているかを評価した。湾中央に生息する *Aplanochytrium* 系統群は、植物プランクトンが生産する炭素のうち  $12.5 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を、*Aplanochytrium* と同じく植物プランクトンを捕食する生物である微小動物プランクトンや植物食性動物プランクトンは、植物プランクトンが生産する炭素のうちそれぞれ、 $42.3 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $149.8 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  を消費していると推測された。よって、湾中央に生息する *Aplanochytrium* 系統群は、真核生物によって消費される植物プランクトンのうち、6.1%を消費していることになる。また、*Aplanochytrium* 系統群が生産する炭素 ( $5.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ )のうち、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンによって、それぞれ  $1.34 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $3.16 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  が消費されていると推定された。微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンは、それぞれ  $72.9 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ ,  $172.0 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  の炭素を消費する (Uye et al. 1996)。よって、湾中央に生息する *Aplanochytrium* は微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンが消費する炭素のうち、それぞれ 1.8%を供給していることになる。さらに、湾中央に生息する *Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の場合について評価した。*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類の生産速度は  $2.7 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  と推定された。この場合、微小動物プランクトンが消費する炭素  $72.9 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$ のうち、 $2.43 \text{ g C/m}^2/\text{yr}$  が *Aplanochytrium* 系統群以外のラビリンチュラ類によって供給していると推測される。つまり、*Aplanochytrium* 系統群以外ラビリンチュラ類は、微小動物プランクトン消費する炭素のうち 3.3%を供給していることになる。

同様に、湾奥に生息するラビリンチュラ類が微小動物プランクトンや植物食性動物プランク

トン、動物食性動物プランクトンに与える影響を評価した結果、真核生物によって消費される植物プランクトンのうち 19.7%を消費し、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンが消費する炭素のうち 6.2%を供給していると推測された。また、*Aplanochytrium* 系統群以外のラビリントウ類は、微小動物プランクトンが消費する炭素のうち 15.2%を供給していると推測された。

これまで、ヤブレッツボカビ類は、分解酵素を分泌することやクロロフィルとの相関関係から、分解者であると推測されてきた (Kimura and Naganuma 2001, Kimura et al. 2001, Ueda et al. 2015, )。本研究では、分解者であると推測されてきたラビリントウ類のうち、*Aplanochytrium* が植物プランクトンから栄養を摂取することを示した。また、*Calanus sinicus* の食性解析の結果、*Aplanochytrium* が *C. sinicus* に捕食されていることが示された (Hirai et al. 2018)。以上のことから、植物プランクトンから *Aplanochytrium*、*Aplanochytrium* から動物プランクトンへの物質が転送される新しい経路の存在が明らかになった。

また、本研究では、定量 PCR によって *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度を調査した結果、*Aplanochytrium* 系統群は 1 年間を通して存在し、季節によって鉛直移動をしている可能性を示した。推定された *Aplanochytrium* 系統群の細胞密度から生産速度を算出し、炭素循環における *Aplanochytrium* 系統群の影響力を評価した。同時に、次世代シーケンサー解析による微生物の群集構造解析から *Aplanochytrium* 系統群以外のラビリントウ類の生産速度を概算し、炭素循環とエネルギーの流れにおける影響力を評価した。

これまで、ラビリントウ類は DHA を合成する経路をもつことから、魚類や動物プランクトンに DHA 供給していると考えられてきた。本研究で *Aplanochytrium* による動物食性動物プランクトンの影響を試算した結果、細胞密度が低い湾央の場合でも、微小動物プランクトンと植物食性動物プランクトンが消費する炭素のうち、それぞれ、1.8%を供給していると推定された。この値は、*Aplanochytrium* が海洋生態系に与えている影響力は、1 属の生物としては大きいといえる。*Aplanochytrium* を含むラビリントウ類は、DHA を体内で合成することができることから、動物プランクトンや魚類に DHA を供給していると考えられており、今回の結果は、*Aplanochytrium* が DHA の供給源となっていることを裏付けた。しかし、当初に想定した影響力よりも小さな値であった。

さらに、世界中の海洋を対象に次世代シーケンサー解析でプランクトンの群集解析を行った TARA OCEANS では、ラビリントウ類は *Aplanochytrium* 系統群のおよそ 5 倍のリード数が検出された。さらに、季節変動するものの、*Aplanochytrium* 系統群を含むラビリントウ類は普遍的に存在した。以上のことから、*Aplanochytrium* 系統群以外のヤブレッツボカビ類が海洋生態系に与える影響力は *Aplanochytrium* よりも大きいと考えられた。

一方、動物プランクトンの食性解析を行った結果、動物プランクトンの消化管から、環境サン

プル（海水）より高い割合で *Aplanochytrium* が検出された（Hirai et al. 2018）。*Aplanochytrium*が選択的に捕食されている、あるいは消化管内に寄生している可能性があり、*Aplanochytrium* と動物プランクトンの関係性に未解明の部分が残っていることを示され、本研究で推定したよりも *Aplanochytrium* の影響力は大きいと考えられた。

*Aplanochytrium* 以外のヤブレッツボカビ類が、何から栄養を摂取しているか、何に食べられているかは、明らかになっていない。さらに、本研究では、*Aplanochytrium* 以外のヤブレッツボカビ類の細胞密度や、生産速度および消費する炭素量を推定するために用いた瞬間増殖率や成長効率、消費する炭素の量を計測していない。今後は、培養実験によって *Aplanochytrium* 以外のヤブレッツボカビ類が何から栄養を摂取しているか、何に食べられているかを明らかにし、生態系における役割を把握する必要がある。また、次世代シーケンサー解析で把握された主要な系統群の細胞密度を定量 PCR で定量するなど、ラビリンチュラ類の細胞密度を系統群ごとに把握し、系統群ごとに影響力を評価する必要がある。

本研究は、培養実験によって、ラビリンチュラ類の *Aplanochytrium* が、生きている珪藻から栄養摂取できること、また、*Aplanochytrium* と珪藻が集合体を形成することから、高次栄養段階の捕食者に消費されることで効率よくエネルギー転送が行われている可能性を示した。さらに、*Aplanochytrium* の細胞密度を定量 PCR によって推定することに成功し、炭素循環における影響力について試算した。地球上の主要な一次生産である珪藻から積極的に栄養摂取する生物の存在を示し、大きな影響力をもつことについて明らかにしたことは、海洋生態系の全体に対する理解の深化に寄与できたものと考えている。

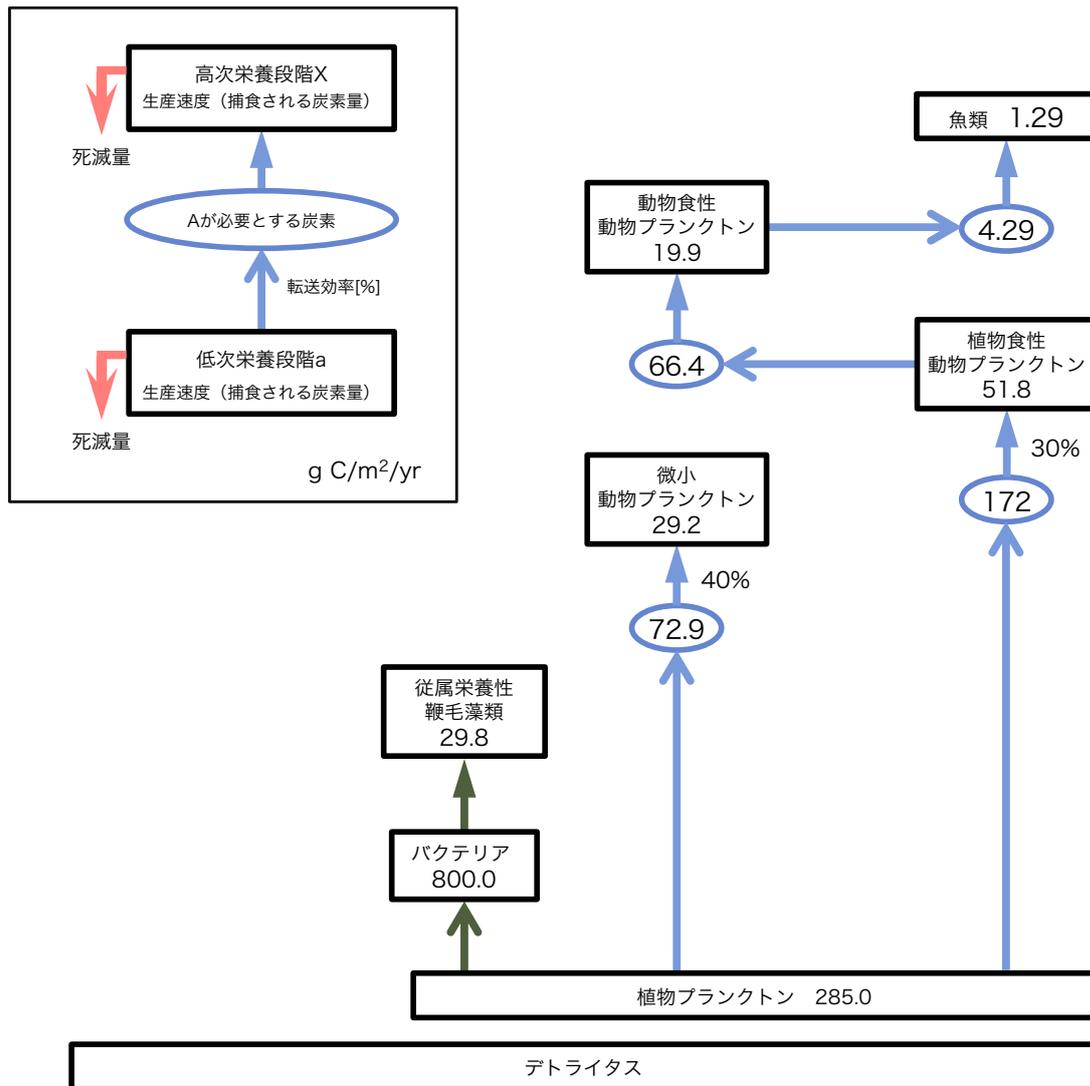


図6-1.瀬戸内海において想定された炭素循環

式-1 : MZが消費する炭素 = MZが生産する炭素 (29.2) / MZの転送効率 (0.4)  
 = 72.9 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-2 : HNZが消費する炭素 = HNZが生産する炭素 (51.8) / HNZの転送効率 (0.3)  
 = 172 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-3 : MZが消費する炭素 (172.0) + HNZが消費する炭素 (72.9)  
 = 244.9 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-4 : PHYが生産する炭素に対するMZとHNZが消費する炭素の割合  
 = PHYが生産する炭素 (244.9) / MZとHNZが消費する炭素 (285.0) × 100  
 = 85.9%

式-5 : BAが分解できるPHYが生産する炭素  
 = PHYが生産する炭素 (285.0) - MZとHNZが消費する炭素 (244.9)  
 = 40.1 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-6 : PHYが生産する炭素に対するBAが分解できる炭素の割合  
 = BAが分解できるPHYが生産する炭素 (40.1) / PHYが生産する炭素 (285.0) × 100  
 = 14.1%

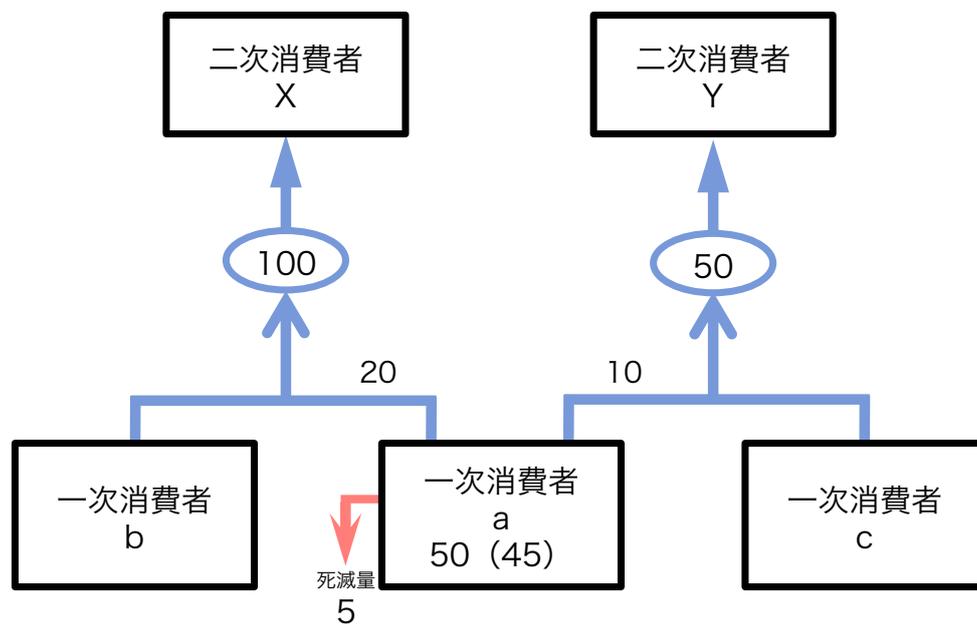


図6-2.高次栄養段階の消費者が消費する炭素に関する仮説

高次栄養段階の消費者（XとY）が消費するそれぞれの炭素の比と、低次栄養段階の消費者（a）が生産し高次栄養段階の消費者（XとY）に供給する炭素の比が同じと仮定した。例えば、それぞれ100 g C/m<sup>2</sup>/yr、50 g C/m<sup>2</sup>/yrの炭素を消費するXとY、50 g C/m<sup>2</sup>/yrの炭素を生産するaが存在する場合について考える。aは、50 g C/m<sup>2</sup>/yrの炭素を生産し、90%に相当する45 g C/m<sup>2</sup>/yrはXとYに100 : 50の比で炭素を供給される。つまり、aは、XとYに、それぞれ30 g C/m<sup>2</sup>/yrと15 g C/m<sup>2</sup>/yrの炭素を供給する。また、XとYが消費する残りの70 g C/m<sup>2</sup>/yrと35 g C/m<sup>2</sup>/yrの炭素は、他の低次栄養段階の消費者（bとc）が供給すると想定した。

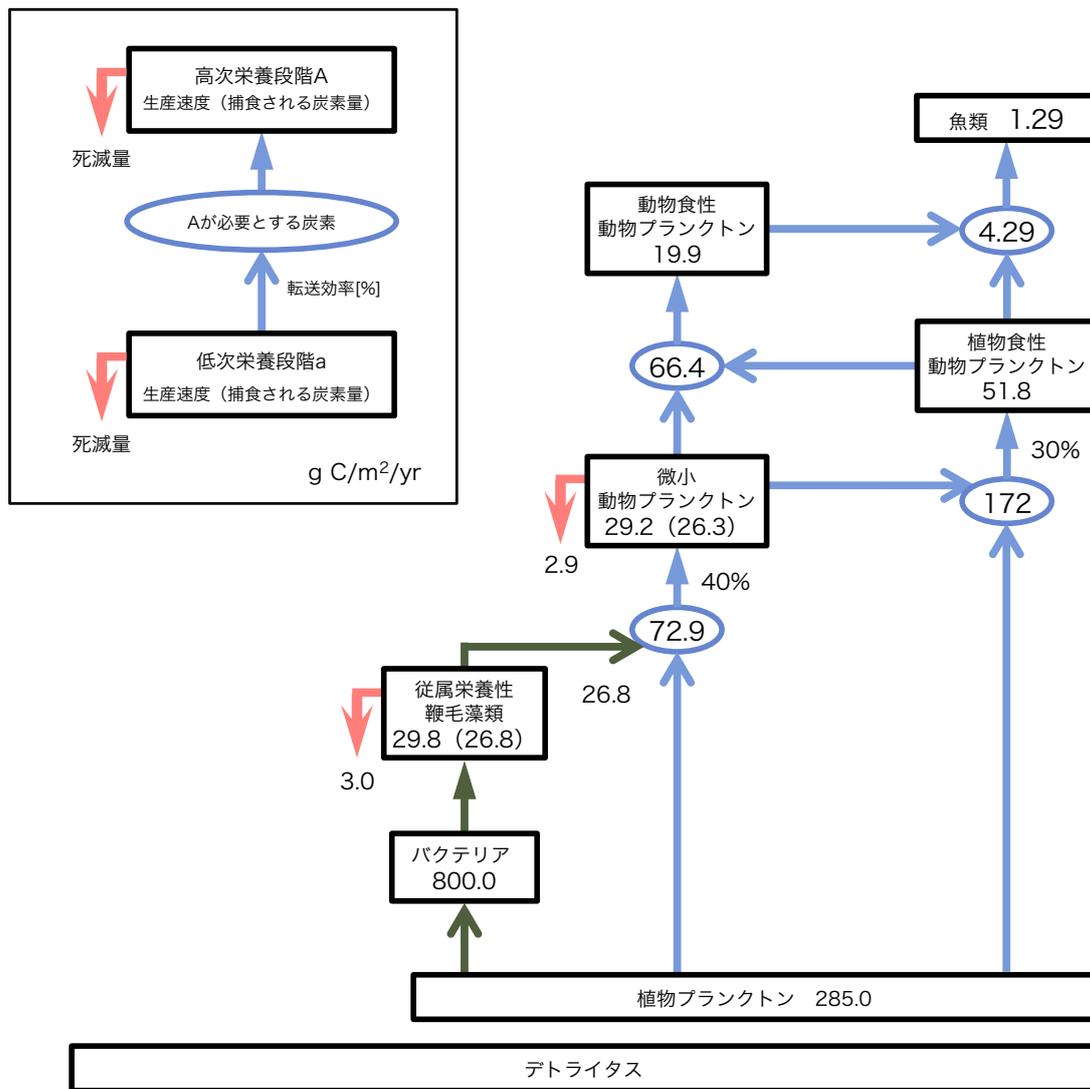


図6-3.死滅量を想定した炭素循環

式-7：HNの死滅量 = HNが生産する炭素 (29.8) × 10%  
 = 3.0 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-8：HNの被食量 = HNが生産する炭素 (29.8) - HNの死滅量 (3.0)  
 = 26.8 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-9：MZの死滅量 = MZが生産する炭素 (29.2) × 10%  
 = 2.9 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-10：MZの被食量 = MZが生産する炭素 (29.2) - MZの死滅量 (2.9)  
 = 26.3 g C/m<sup>2</sup>/yr

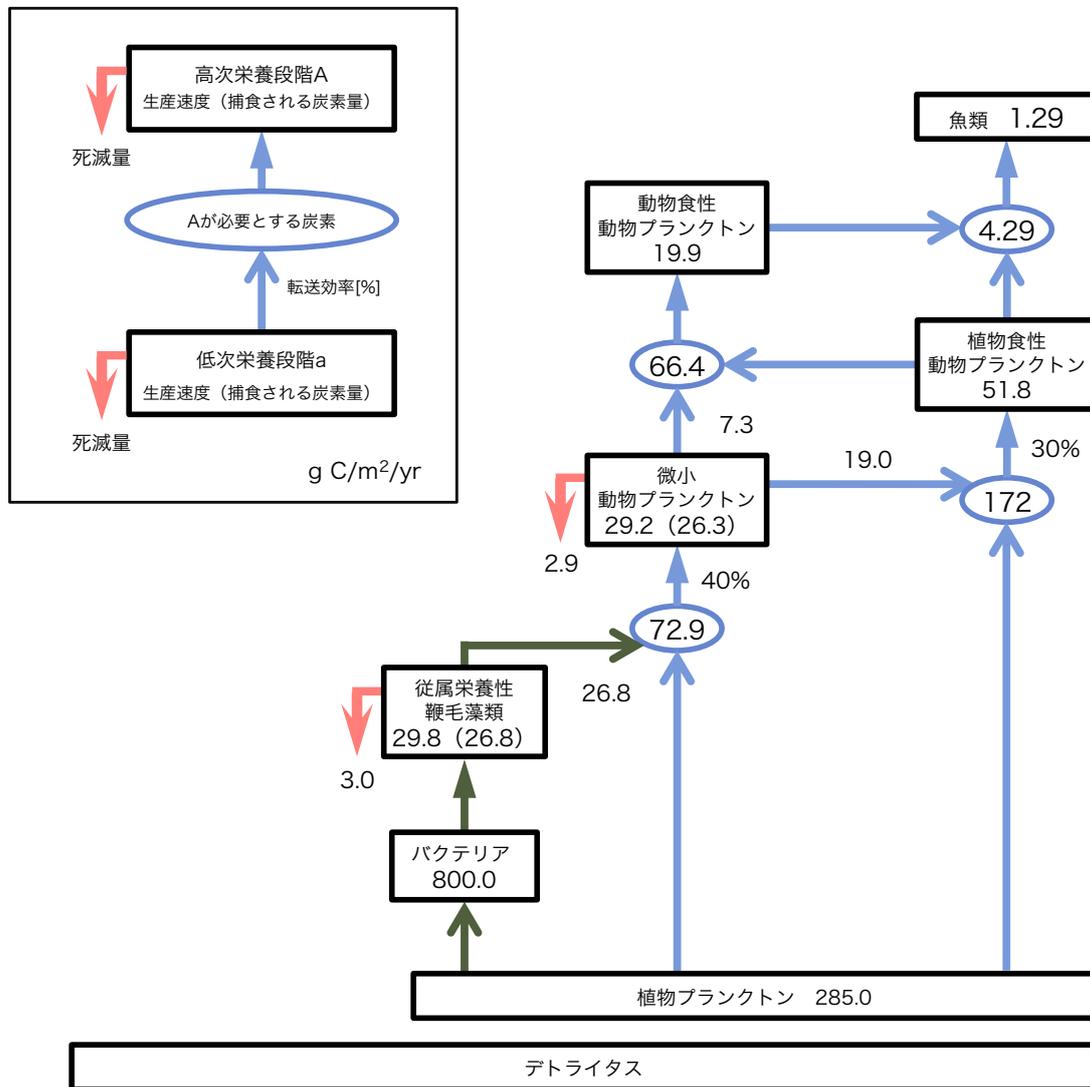


図6-3.死滅量を想定した炭素循環（続き）

式-11 : MZが供給するHNZが消費する炭素 : MZが供給するCNZが消費する炭素  
 = HNZが消費する炭素 (172.0) : CNZ (66.4) が消費する炭素  
 = 19.0 g C/m<sup>2</sup>/yr : 7.3 g C/m<sup>2</sup>/yr

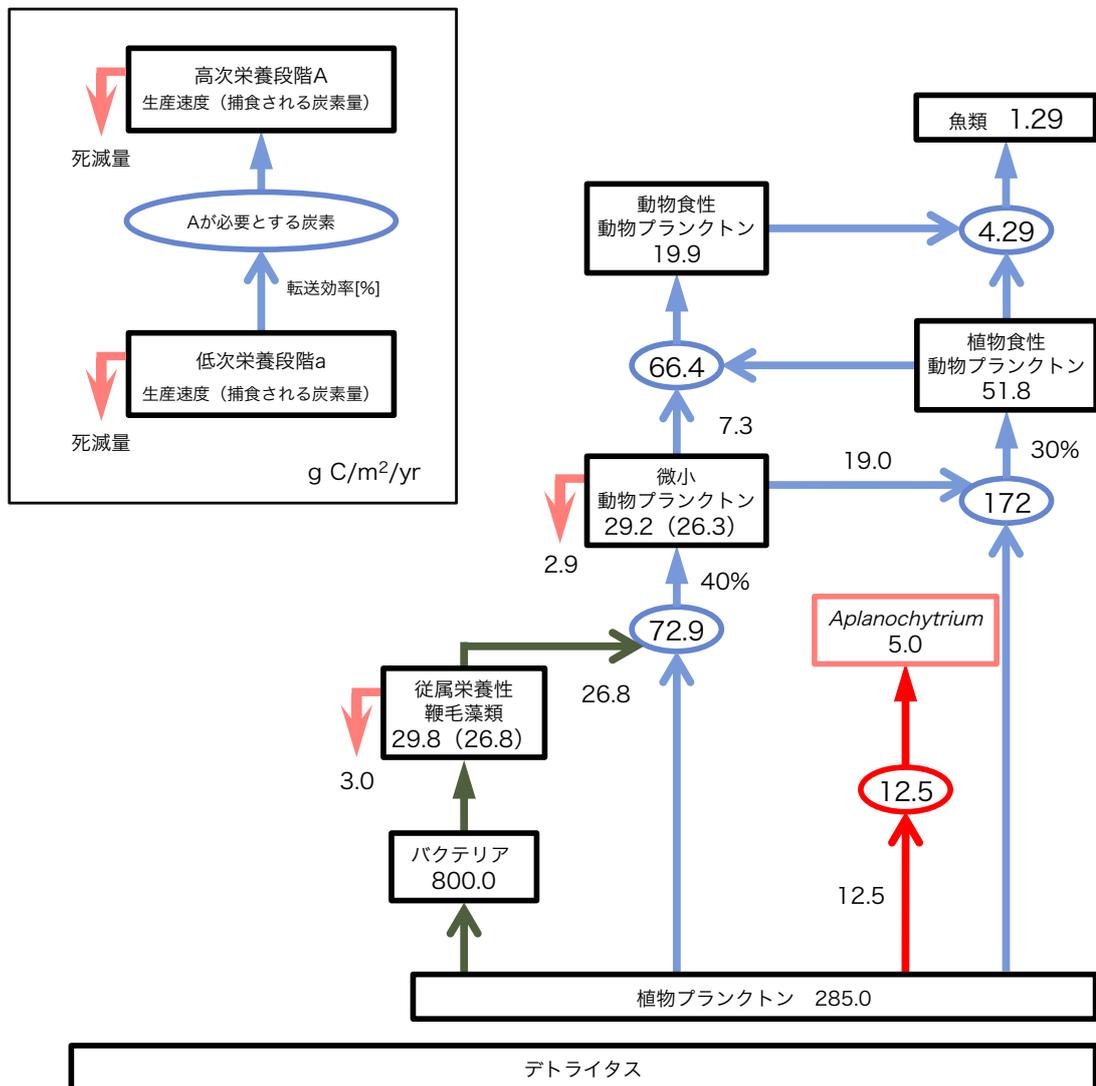


図6-4. *Aplanochytrium* を含む炭素循環

式-12 : APが消費する炭素 = APが生産する炭素 (5.0) / APの転送効率 (0.4)  
 = 12.5 g C/m<sup>2</sup>/yr

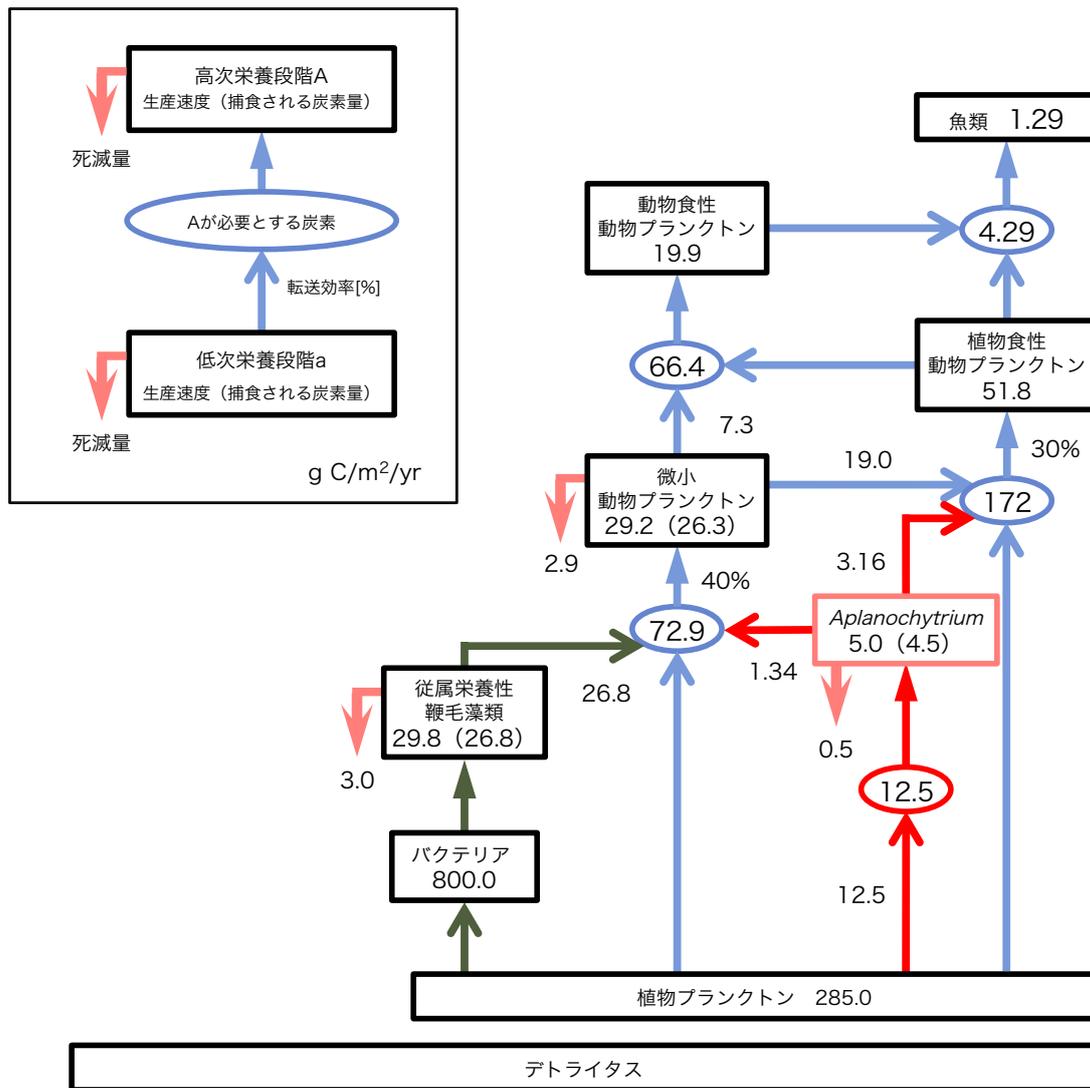


図6-4. *Aplanochytrium* を含む炭素循環 (続き)

式-13 : APの死滅量 = APが生産する炭素 (5.0) × 10%  
 = 0.5 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-14 : MZの被食量 = APが生産する炭素 (5.0) - MZの死滅量 (0.5)  
 = 4.5 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-15 : APが供給するMZが消費する炭素 : APが供給するHNZが消費する炭素  
 = HNZが消費する炭素 (72.9) : CNZ (172.0) が消費する炭素  
 = 1.34 g C/m<sup>2</sup>/yr : 3.16 g C/m<sup>2</sup>/yr

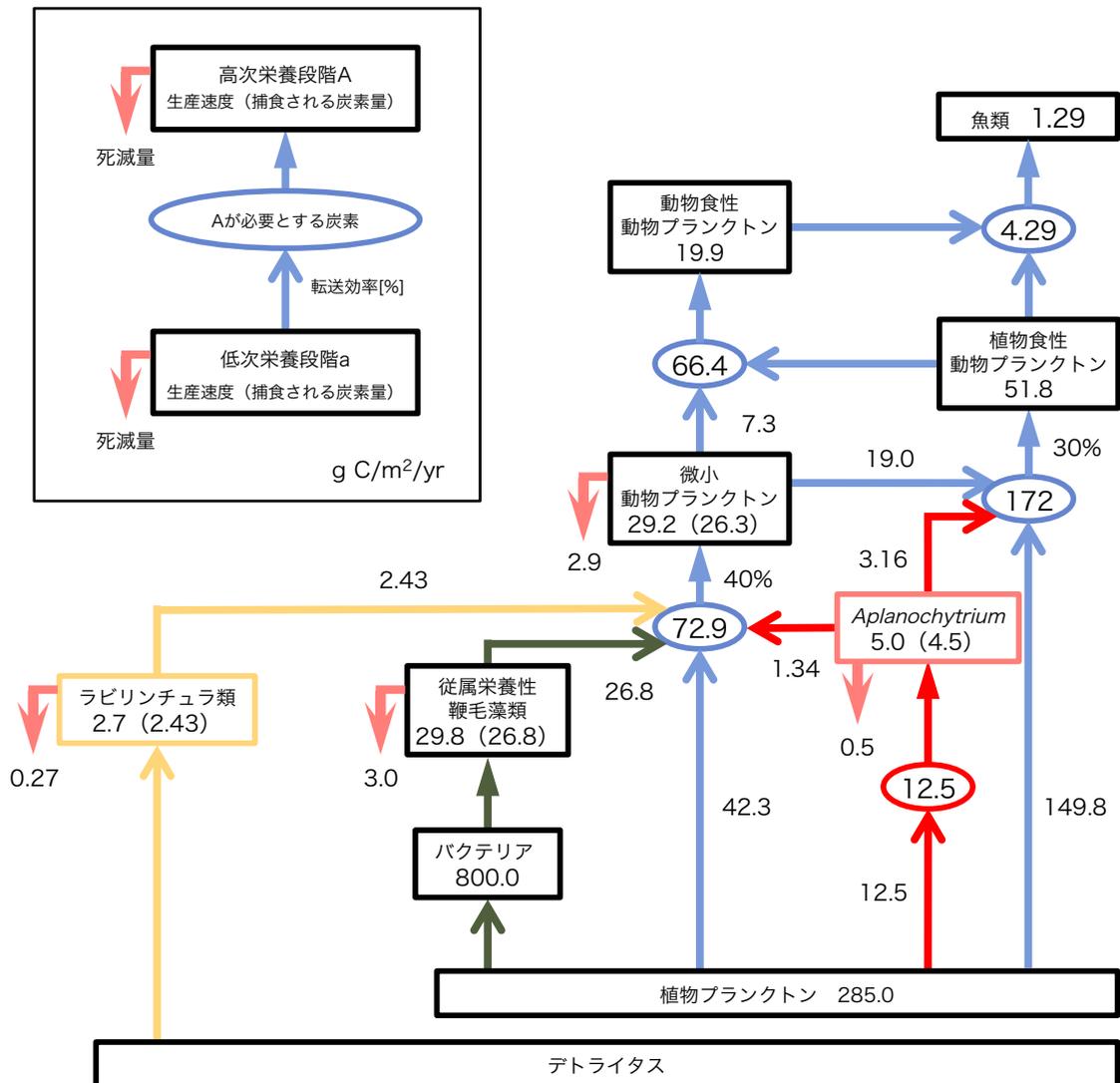


図6-5. *Aplanochytrium* 以外のラビリントチュラ類を含む炭素循環

式-16 : LABYの死滅量 = LABYが生産する炭素 (2.7) × 10%  
 = 0.27 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-17 : LABYの被食量 = LABYが生産する炭素 (2.7) - MZの死滅量 (0.27)  
 = 2.43 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-18 : PHYが生産する炭素のうちMZに消費されている炭素  
 = MZが消費する炭素 (72.9) - HNとAPとLABYが供給している炭素 (26.8+1.34+2.46)  
 = 42.3 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-19 : PHYが生産する炭素のうちHNZに消費されている炭素  
 = HNZが消費する炭素 (172.0) - MZとAPが供給している炭素 (19.0+3.2)  
 = 149.8 g C/m<sup>2</sup>/yr

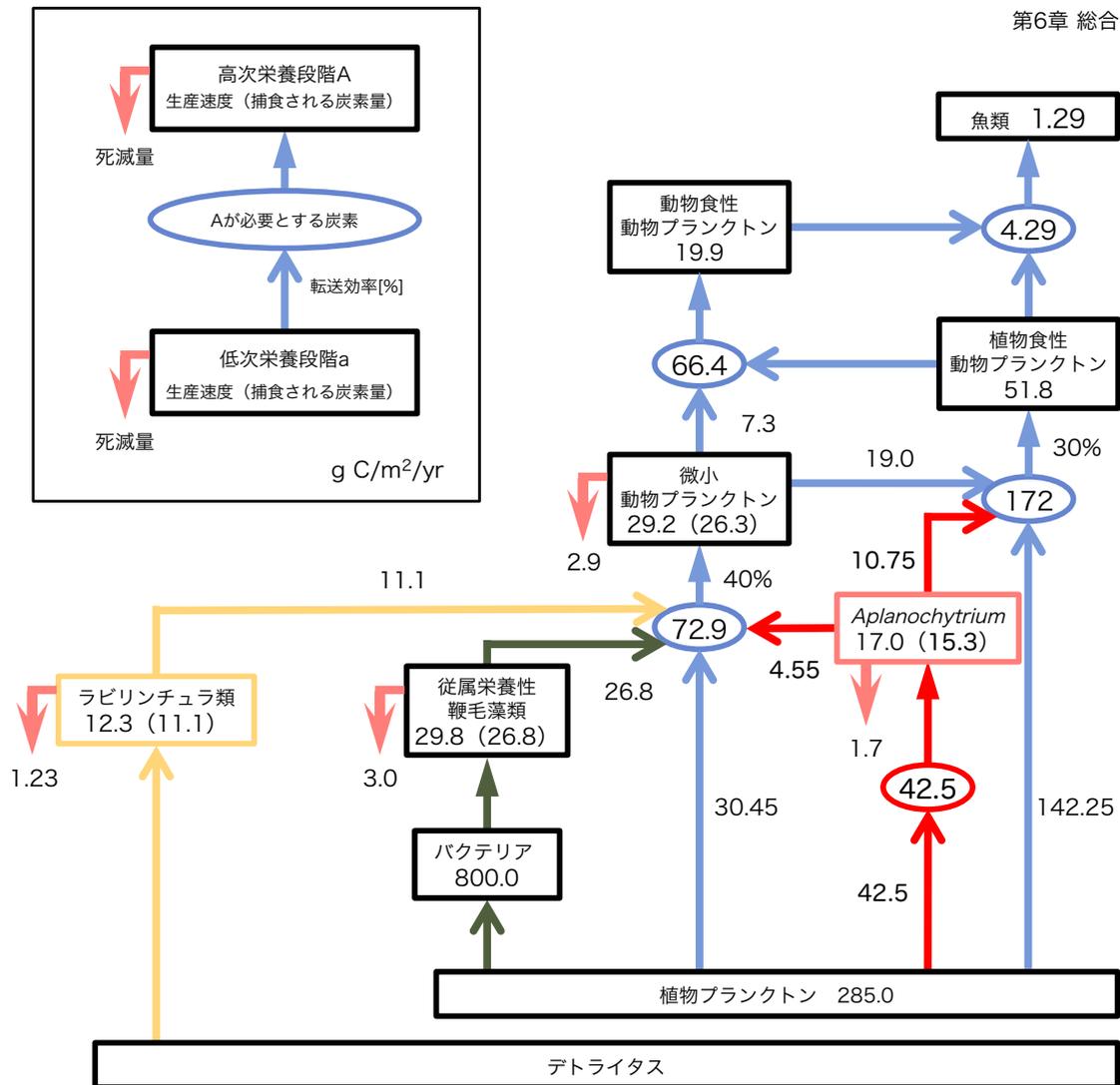


図6-6. *Aplanochytrium* を含むラビリントウ類の湾奥の炭素循環

式-20 : APが消費する炭素 = APが生産する炭素 (17.0) / APの転送効率 (0.4)  
 = 42.5 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-21 : APの死滅量 = APが生産する炭素 (17.0) × 10%  
 = 1.7 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-22 : MZの被食量 = APが生産する炭素 (5.0) - MZの死滅量 (0.5)  
 = 15.3 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-23 : APが供給するMZが消費する炭素 : APが供給するHNZが消費する炭素  
 = HNZが消費する炭素 (72.9) : CNZ (172.0) が消費する炭素  
 = 4.55 g C/m<sup>2</sup>/yr : 10.75 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-24 : LABYの死滅量 = LABYが生産する炭素 (12.3) × 10%  
 = 1.23 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-25 : LABYの被食量 = LABYが生産する炭素 (12.3) - MZの死滅量 (1.23)  
 = 11.1 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-26 : PHYが生産する炭素のうちMZに消費されている炭素  
 = MZが消費する炭素 (72.9) - HNとAPとLABYが供給している炭素 (26.8+4.55+11.1)  
 = 30.45 g C/m<sup>2</sup>/yr

式-27 : PHYが生産する炭素のうちHNZに消費されている炭素  
 = HNZが消費する炭素 (172.0) - [MZとAPが供給している炭素 (19.0+10.75) ]  
 = 142.25 g C/m<sup>2</sup>/yr

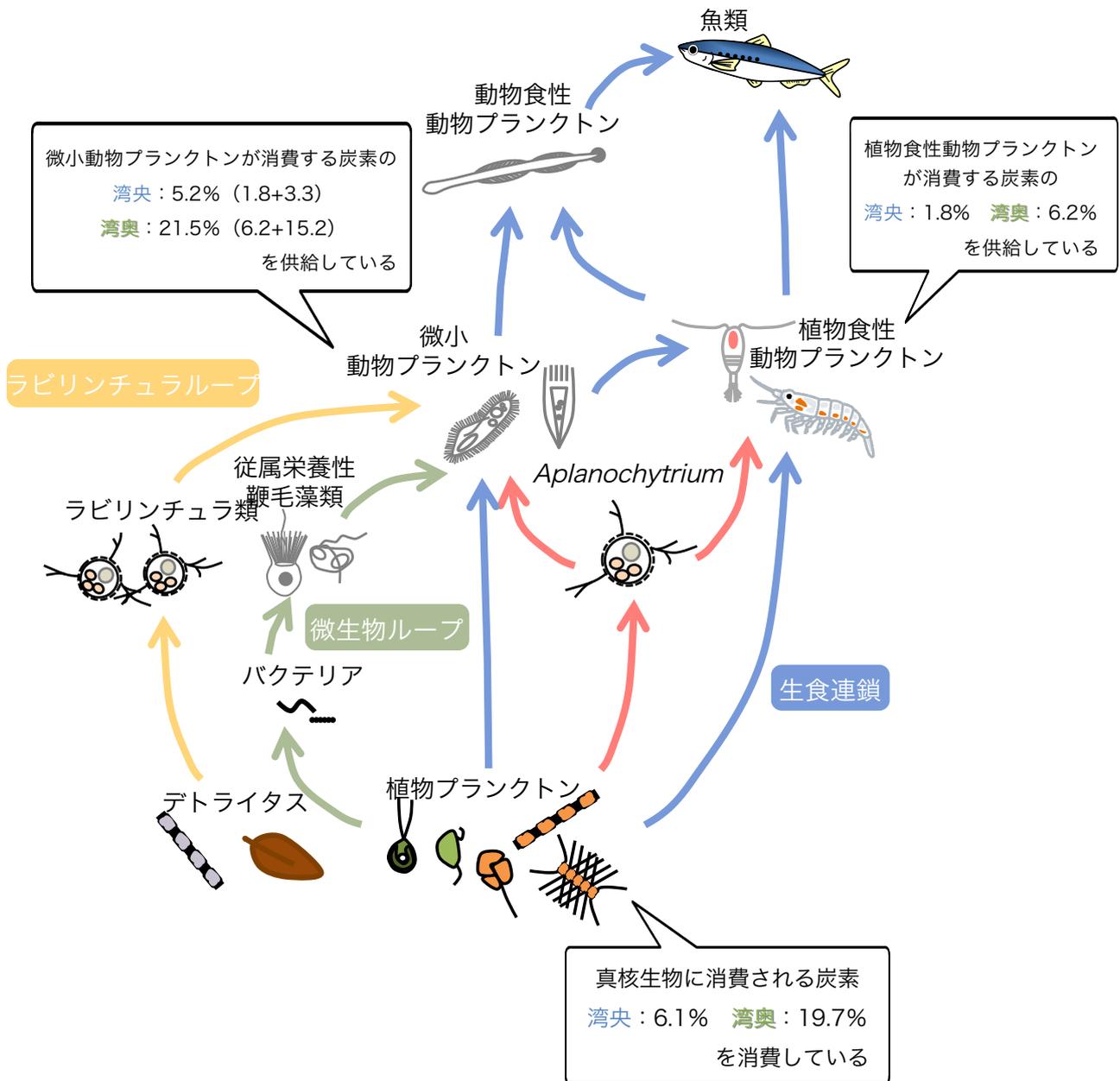


図.6-7. *Aplanochytrium*とラビリントウラ類を含む海洋生態系



## 引用文献

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012; 59: 429-493.

Aki T, Hachida K, Yoshinaga M, Katai Y, Yamasaki T, Kawamoto S, Kakizono T, Maoka T, Shigeta S, Suzuki O, Ono K. Thraustochytrid as a Potential Source of Carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2003; 80(8): 789-794.

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 1919-1925.

Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse SM. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6372.

Andersen RA, Bidigare RR, Keller MD, Latasa M. A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography.* 1996; 43: 517-537.

Anderson OR, Cavalier-Smith T. Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a new small freshwater species, and a revised analysis of *Labyrinthulea* (Heterokonta). *Acta Protozool.* 2012; 51: 291-304.

Ara K, Hiromi J. Seasonal variability in plankton food web structure and trophodynamics in the neritic area of Sagami Bay, Japan. *J. Oceanogr.* 2009; 65: 757-779.

Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*. 1983; 10: 257-263

Azevedo C, Corral L. Some ultrastructural observations of a thraustochytrid (Protoctista, Labyrinthulomycota) from the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 1997; 31: 73-78.

Bahnweg G, Sparrow FK Jr. *Aplanochytrium kerguelensis* gen. nov. spec. nov., a new phycomycete from subantarctic marine waters. *Arch. Mikrobiol.* 1972; 81: 45-49.

Bai M, Sen B, Wang Q, Xie Y, He Y, Wang G. Molecular Detection and Spatiotemporal Characterization of Labyrinthulomycete Protist Diversity in the Coastal Waters Along the Pearl River Delta. *Microb. Ecol.* 2018; doi: 10.1007/s00248-018-1235-8.

Bajpai P, Bajpai PK, Ward OP. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991a; 35: 706-710.

Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1991b; 68: 509-514.

Baldauf SL. The deep roots of eukaryotes. *Science*. 2003; 300:1703-1706.

Barclay W, Zeller S. Nutritional enhancement of *n*-3 and *n*-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*. 1996; 27(3): 314-322.

- Behnke A, Bunge J, Barger K, Breiner HW, Alla V, Stoeck T. Microeukaryote community patterns along an O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S gradient in a supersulfidic anoxic fjord (Framvaren, Norway). *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 3626-3636.
- Bell MV, Tocher DR. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Arts MT, Brett MT, Kainz MJ (eds), *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer-Verlag New York, 2009; 211-236.
- Bigelow DM, Olsen MW, Gilbertson RL. *Labyrinthula terrestris* sp. nov., a new pathogen of turf grass. *Mycologia.* 2005; 97: 185-190.
- Blegvad H. An epidemic disease of eel-grass. (*Zostera marina* L.). *Dan. biol. Stn. Rep.* 1934; 39: 1-8.
- Bochdansky AB, Clouse MA, Herndl GJ. Eukaryotic microbes, principally fungi and labyrinthulomycetes, dominate biomass on bathypelagic marine snow. *ISME J.* 2017; 11: 362-373.
- Bongiorni L, Dini F. Distribution and abundance of thraustochytrids in different Mediterranean coastal habitats. *AME.* 2002; 30: 49-56.
- Bongiorni L, Dini F. Thraustochytrids, fungoid protists in Mediterranean sandy shores. *Marine Biotechnology.* 2004; 6: S71-S75.
- Bongiorni L, Pusceddu A, Danovaro R. Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytrids involved in organic matter degradation. *AME.* 2005; 41: 299-305.
- Booth T, Miller CE. Comparative morphologic and taxonomic studies in the genus *Thraustochytrium*. *Mycologia.* 1968; 60: 480-495.

Bower SM, McLean N, Whitaker DJ. Mechanism of infection by *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of abalone (*Haliotis kamtschatkana*) (Mollusca: Gastropoda). *J. Invertebr. Pathol.* 1989; 53: 401-409.

Bowers HA, Tengs T, Glasgow HB Jr, Burkholder JM, Rublee PA, Oldach DW. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 4641-4648.

Bremer GB, Talbot G. Cellulolytic enzyme activity in the marine protist *Schizochytrium aggregatum*. *Bot Mar.* 1995; 38: 37-41.

Bremer GB. Lower marine fungi (labyrinthulomycetes) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia.* 1995; 295: 89-95.

Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 1997; 151: 315-331.

Calvo LMR, Walker JG, Burrenson EM. Prevalence and distribution of QPX, Quahog Parasite Unknown, in hard clams *Mercenaria mercenaria* in Virginia, USA. *Dis. Aquat. Org.* 1998; 33: 209-219.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010; 7: 335-336.

Carmona ML, Naganuma T, Yamaoka Y. Identification by HPLC-MS carotenoids of the *Thraustochytrium* CHN-1 strain isolated from the Seto Island Sea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003; 67: 884-888.

Chamberlain AHL. Cytochemical studies on the cell walls of *Thraustochytrium* spp. *Marina*. 1980; 23: 669-677.

Chen M, Liu H, Chen B. Effects of dietary essential fatty acids on reproduction rates of a subtropical calanoid copepod, *Acartia erythraea*. *Marine Ecology Progress Series*. 2012; 455: 95-110.

Chihara M, Murano M. An illustrated guide to marine plankton in Japan. Tokyo: Tokai University Press; 1997.

Chu FLE, Lund ED, Jennifer A. Podbesek. Quantitative significance of n-3 essential fatty acid contribution by heterotrophic protists in marine pelagic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008; 354: 85-95.

Cienkowski L. Über den Bau und die Entwicklung der Labyrinthuleen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1867; 3: 274-310.

Cole JJ, Findlay S, Pace M. Bacterial Production in Fresh and Saltwater Ecosystems – a Cross-System Overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1988; 43: 1-10.

Collado-Mercado E, Radway JC, Collier JL. Novel uncultivated labyrinthulomycetes revealed by 18S rDNA sequences from seawater and sediment samples. *Aquat. Microb. Ecol.* 2010; 58: 215-228.

Cotton AD. Disappearance of *Zostera marina*. 1933; 132: 277.

Damare V, Raghukumar S. Association of the stramenopilan protists, the aplanochytrids, with zooplankton of the equatorial Indian Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2010; 399: 53-68.

Damare V, Raghukumar S. Morphology and physiology of the marine straminipilan fungi, the aplanochytrids isolated from the equatorial Indian Ocean. *Indian J. Mar. Sci.* 2006; 35: 326-340.

Damare VS, Damare S, Ramanujam P, Meena RM, Raghukumar S. Preliminary studies on the association between zooplankton and the stramenopilan fungi, aplanochytrids. *Microb Ecol.* 2013; 65 :955-963.

Dawson SC, Pace NR. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 8324-8329.

de Vargas C, Audic S, Henry N, Decelle J, Mahé F, Logares R, Lara E, Berney C, Le Bescot N, Probert I, Carmichael M, Poulain J, Romac S, Colin S, Aury JM, Bittner L, Chaffron S, Dunthorn M, Engelen S, Flegontova O, Guidi L, Horák A, Jaillon O, Lima-Mendez G, Lukeš J, Malviya S, Morard R, Mulot M, Scalco E, Siano R, Vincent F, Zingone A, Dimier C, Picheral M, Searson S, Kandels-Lewis S; Tara Oceans Coordinators, Acinas SG, Bork P, Bowler C, Gorsky G, Grimsley N, Hingamp P, Iudicone D, Not F, Ogata H, Pesant S, Raes J, Sieracki ME, Speich S, Stemmann L, Sunagawa S, Weissenbach J, Wincker P, Karsenti E. Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science.* 2015; 348: 1261605. doi: 10.1126/science.1261605.

Delong EF, Yayanos AA. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51: 730-737.

Doi K, Honda D. Proposal of *Monorhizochytrium globosum* gen. nov., comb. nov. (Stramenopiles, Labyrinthulomycetes) for former *Thraustochytrium globosum* based on morphological features and phylogenetic relationships. *Phycological Research.* 2017; 65:

Dykstra M, Porter D. *Diplophrys marina*, a new scale-forming marine protist with labyrinthulid affinities. *Mycologia*. 1984; 1: 626-632.

Dzhembekova N, Urusizaki S, Moncheva S, Ivanova P, Nagai S. Applicability of massively parallel sequencing on monitoring harmful algae at Varna Bay in the Black Sea. *Harmful Algae*. 2017; 68: 40-51.

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2460-2461.

Edgcomb VP, Kysela DT, Teske A, de Vera Gomez A, Sogin ML. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 7658-7662.

Estudillo-del Castillo C, Gapasin RS, Leaño EM. Enrichment potential of HUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 2009; 293: 57-61.

Estudillo-del Castillo C, Gapasin RS, Leaño EM. Enrichment potential of HUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 2009; 293: 57-61.

Fan KW, Chen F, Jones EBG, Vrijmoed LLP. Utilization of food processing waste by thraustochytrids. *Fungal Diversity*. 2000; 5: 185-194.

Fenchel T. Marine plankton food chains. *Annual Reviews Ecology and Systematics*. 1988; 19: 19-38.

Fenchel T. The microbial loop - 25 years later. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008; 366: 99-103.

Fiorito R, Leander C, Leander B. Characterization of three novel species of Labyrinthulomycota isolated from ochre sea stars (*Pisaster ochraceus*). *Mar. Biol.* 2016; 163, 170.

Fossier Marchan L, Lee Chang KJ, Nichols PD, Mitchell WJ, Polglase JL, Gutierrez T. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: A review. *Biotechnol Adv.* 2018; 36: 26-46.

Fuller MS. Hyphochytriomycota. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota: Systematics and Evolution Part 1*. 2001. 73–80.

Gaertner A. Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer, mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven. Supplement.* 1968; 3: 75-92.

Gaertner A. Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi) I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. *Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremerhav.* 1977; 16: 139–157.

Gaertner A. Some fungal parasites found in the diatom populations of the Rusfjord area (South Norway) during March 1979. *Veroeff. Inst. Meeresforsch Bremerhav.* 1979; 18: 29-33.

Gladyshev MI, Sushchik NN, Makhutova ON. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013; 107: 117-126.

Godhe A, Asplund ME, Härnström K, Saravanan V, Tyagi A, Karunasagar I. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74: 7174-7182.

Goldstein S, Belsky M. Axenic culture studies of a new marine Phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *Am. J. Bot.* 1964; 51: 72–78.

Gomaa F, Mitchell EA, Lara E. Amphitremida (poche, 1913) is a new major, ubiquitous labyrinthulomycete clade. *PLoS One.* 2013;8(1): e53046.

Gong J, Dong J, Liu X, Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist.* 2013; 164: 369-379.

Grami B, Rasconi S, Niquil N, Jobard M, Saint-Béat B, Sime-Ngando T. Functional effects of parasites on food web properties during the spring diatom bloom in Lake Pavin: a linear inverse modeling analysis. *PLoS One.* 2011; 6: e23273. doi: 10.1371

Gromov BV, Pljusch AV, Mamkaeva KA. Cultures of *Rhizophyidium* spp. (Chytridiales)—parasites of chlorococcalean algae. *Algol. Stud.* 1999; 95: 115–123.

Guillard RR, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 1962; 8: 229-239.

Hallegraeff G. A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase. *Phycologia.* 1993; 32: 79-99.

Hariganeya N, Tanimoto Y, Yamaguchi H, Nishimura T, Tawong W, Sakanari H, Yoshimatsu T, Sato S, Preston CM, Adachi M. Quantitative PCR method for enumeration of cells of cryptic species of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in coastal waters of Japan. *PLoS One.* 2013; 8: e57627.

Hashimoto H, Hashimoto T, Matsuda O, Tamai K, Uye S, Yamamoto T. Biological productivity of lower trophic levels of the Seto Inland Sea of Japan. The Viewpoint of Fisheries. 1997; 17-58.

Hayashi M, Yukino T, Watanabe F, Miyamoto E, Nakano Y. Effect of vitamin B12-enriched thraustochytrids on the population growth of rotifers. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007; 71: 222-225.

Hirai J, Hamamoto Y, Honda D, Hidaka K. Possible aplanochytrid (Labyrinthulea) prey detected using 18S metagenetic diet analysis in the key copepod species *Calanus sinicus* in the coastal waters of the subtropical western North Pacific. Plankton Benthos Res. 2018; 13: 75-82.

Hirai J, Hidaka K, Nagai S, Ichikawa T. Molecular-based diet analysis of the early post-larvae of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* and Pacific round herring *Etrumeus teres*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2017a; 564: 99-113.

Hirai J, Katakura S, Kasai H, Nagai S. Cryptic Zooplankton Diversity Revealed by a Metagenetic Approach to Monitoring Metazoan Communities in the Coastal Waters of the Okhotsk Sea, Northeastern Hokkaido. Front. Mar. Sci. 2017b; 4: doi: 10.3389/fmars.2017.00379.

Hirai J, Nagai S, Hidaka K. Evaluation of metagenetic community analysis of planktonic copepods using Illumina MiSeq: Comparisons with morphological classification and metagenetic analysis using Roche 454. PLoS One. 2017c; 12: e0181452.

Hirai J, Yasuike M, Fujiwara A, Nakamura Y, Hamaoka S, Katakura S, Takano Y, Nagai S. Effects of plankton net characteristics on metagenetic community analysis of metazoan zooplankton in a coastal marine ecosystem. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2015; 469: 36-43.

Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Raghukumar S, Nakagiri A, Schaumann K. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999; 6: 637-647.

Hulsemann K. *Calanus sinicus* Brodsky and *C. jashnovi*, nom. nov. (Copepoda: Calanoida) of the north-west Pacific Ocean: a comparison, with notes on the integumental pore pattern in *Calanus* s. str. *Invertebr. Taxon.* 1994; 8: 1461-1482.

Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS. Genet.* 2008; 4(11): e1000255.

Ibelings BW, De Bruin A, Kagami M, Rijkeboer M, Brehm M, Van Donk E. Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (*Chytridiomycota*). *J. Phycol.* 2004; 40: 437-453.

Ikeda T, Motoda S. Estimated zooplankton production and their ammonia excretion in the Kuroshio and adjacent seas. *Fish. Bull.* 1978; 76: 357-366.

Ishii K, Mussmann M, MacGregor BJ, Amann R. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004; 50: 203-213.

Izquierdo MS, Watanabe T, Takeuchi T, Arakawa T, Kitajima C. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan GakkaiShi.* 1989; 55: 859-867.

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM,

Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006; 443: 818-822.

Johnson PTJ, Longcore JE, Stanton DE, Carnegie RB, Shields JD, Preu ER. Chytrid infections of *Daphnia pulicaria*: development, ecology, pathology and phylogeny of *Polycaryum laeve*. *Freshw. Biol.* 2006; 51: 634–648.

Jones EBG, Alderman DJ. *Althornia crouchii* gen. et sp. nov., a marine biflagellate fungus. *Nova Hedwigia*. 1971; 21: 381–99.

Joshi NA, Fass JN. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. 2011. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.

Kagami M, de Bruin A, Ibelings BW, Van Donk. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*. 2007a; 578: 113-129.

Kagami M, Miki T, Takimoto G. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front Microbiol.* 2014; 5: 166. doi: 10.3389/fmicb.2014.00166. eCollection 2014.

Kagami M, von Elert E, Ibelings BW, de Bruin A, van Donk E. The parasitic chytrid, *Zygorhizidium*, facilitates the growth of the cladoceran ooplankter, *Daphnia*, in cultures of the inedible alga, *Asterionella*. *Proc. Biol. Sci.* 2007; 274: 1561-1566.

Kanchana R, Muraleedharan UD, Raghukumar S. Alkaline lipase activity from the marine protists, thraustochytrids. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011; 27: 2125-2131.

Kawachi M, Inouye I, Honda D, O'Kelly CJ, Bailey JC, Bidigare RR, Andersen RA. The Pinguiphyceae *classis nova*, a new class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids. *J. Phycol.* 2002; 50: 31-47.

Kaya K, Nakazawa A, Matsuura H, Honda D, Inouye I, Watanabe MM. Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011; 75: 2246-2248.

Kimura H, Fukuba T, Naganuma T. Biomass of thraustochytrid protists in coastal water. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999; 189: 27-33.

Kimura H, Naganuma T. Thraustochytrids: a neglected agent of the marine microbial food chain. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 2001; 4: 13-18.

Kimura H, Sato M, Sugiyama C, Naganuma T. Coupling of thraustochytrids and POM, and of bacterio- and phytoplankton in a semi-enclosed coastal area: implication for different substrate preference by the planktonic decomposers. *AME.* 2001; 25: 293-300.

Kirshtein JD, Anderson CW, Wood JS, Longcore JE, Voytek MA. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Dis. Aquat. Org.* 2007; 77: 11-15.

Kobayashi Y, Ookubo M. Studies on the marine Phycomycetes. *Bull. Natl. Sci.* 1953; 33: 53-65.

Lampert W, Sommer U. Food chains and food webs. In: Lampert W, Sommer U (eds) Limnoecology. Oxford University Press, New York. 1997: 256-259.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007; 23: 2947-2948.

Leander CA, Porter D, Leander BS. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). Eur. J. Protistol. 2004; 40: 317-328.

Leander CA, Porter D. The Labyrinthulomycota is comprised of three distinct lineages. Mycologia. 2001; 93: 459-464.

Leblanc K, Arístegui J, Armand L, Assmy P, Beker B, Bode A, Breton E, Cornet V, Gibson J, Gosselin MP, Kopczynska E, Marshall H, Peloquin J, Piontkovski S, Poulton AJ, Quéguiner B, Schiebel R, Shipe R, Stefels J, van Leeuwe MA, Varela M, Widdicombe C, Yallop M. A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean. Earth Syst. Sci. Data. 2012; 4: 149-165.

Lee SO, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 4334-4339.

Lefèvre E, Jobard M, Venisse JS, Bec A, Kagami M, Amblard C, Sime-Ngando T. Development of a Real-Time PCR assay for quantitative assessment of uncultured freshwater zoosporic fungi. J. Microbiol. Methods. 2010; 81: 69-76.

Legendre L, Le Fèvre J. From Individual Plankton Cells To Pelagic Marine Ecosystems And To Global Biogeochemical Cycles. Particle Analysis in Oceanography. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1991.

- Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA. The Biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.* 1999; 1: 580-587.
- Li Q, Wang X, Liu X, Jiao N, Wang G. Abundance and novel lineages of thraustochytrids in Hawaiian waters. *Microb. Ecol.* 2013; 66: 823-830.
- Liu H, Probert I, Uitz J, Claustre H, Aris-Brosou S, Frada M, Not F, de Vargas C. Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106: 12803-12808.
- López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, Moreira D. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature.* 2001; 409: 603-607.
- Luo Q, Krumholz LR, Najjar FZ, Peacock AD, Roe BA, White DC, Elshahed MS. Diversity of the microeukaryotic community in sulfide-rich Zedletone Spring (Oklahoma). *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 6175-6184.
- Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011; 27: 2957-2963.
- Mansour MP, Volkman JK, Jackson AE, Blackburn SI. The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *J. Phycol.* 1999; 35: 710-720.
- Matsuura H, Nakazawa A, Ueda M, Honda D, Watanabe MM, Kaya K. On the bio-rearrangement into fully saturated fatty acids-containing triglyceride in *Aurantiochytrium* sp. *Procedia. Environ Sci.* 2012; 15: 66-72.
- Miller JD, Jones EBG. Observations on the association of thraustochytrid marine fungi with decaying seaweed. *Bot. Mar.* 1983; 26: 345-351.
- Milne LJ, Milne MJ. The eelgrass catastrophe. *Sci. Am.* 1951; 184: 52-55.

Moorthi SD, Countway PD, Stauffer BA, Caron DA. Use of quantitative real-time PCR to investigate the dynamics of the red tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Microb. Ecol.* 2006; 52: 136-150.

Moro I, Negrisolo E, Callegaro A, Andreoli C. *Aplanochytrium stocchinoi* a new labyrinthulomycota from the southern ocean (Ross Sea, antarctica). *Protist.* 2003; 154: 331-340.

Moss ST. An ultrastructural study of taxonomically significant characters of the Thraustochytriales and the Labyrinthulales. *Bot. J. Linn. Soc.* 1985; 91: 329-357.

Muehlstein LK, Porter D, Short FT. *Labyrinthula* sp., a marine slime mold producing the symptoms of wasting disease in eelgrass, *Zostera marina*. *Mar. Biol.* 1988; 99: 465-472.

Nagai S, Hida K, Urusizaki S, Takano Y, Hongo Y, Kameda T, Abe K. Massively parallel sequencing-based survey of eukaryotic community structures in Hiroshima Bay and Ishigaki Island. *Gene.* 2016; 576: 681-689.

Nagai S, Urusizaki S, Hongo Y, Chen H, Dzhenbekova N. An attempt to semi-quantify potentially toxic diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* in Tokyo Bay, Japan by using massively parallel sequencing technology. *Plankton Benthos Res.* 2017; 12: 248-258.

Nagano N, Matsui S, Kuramura T, Taoka Y, Honda D, Hayashi M. The distribution of extracellular cellulase activity in marine Eukaryotes, thraustochytrids. *Mar Biotechnol (NY)*. 2011 Apr;13(2):133-136.

Naganuma T, Miura M. Abundance, Production and Viability of Bacterioplankton in the Seto Inland Sea, Japan. *J. Oceanogr.* 1997; 53: 435-442.

- Naganuma T, Kimura H, Karimoto R, Pimenov NV. Abundance of planktonic thraustochytrids and bacteria and the concentration of particulate ATP in the Greenland and Norwegian Seas. *Polar. Biosci.* 2006; 20: 37-45.
- Naganuma T, Takasugi H, Kimura H. Abundance of thraustochytrids in coastal plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998; 162: 105-110.
- Nakahara T, Yokochi T, Higashihara T, Tanaka S, Yaguchi T, Honda D. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acid by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Island. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 73: 1421-1426.
- Nakai R, Nakamura K, Jadoon WA, Kashihara K, Naganuma T. Genus-specific quantitative PCR of thraustochytrid protists. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2013; 486: 1-12.
- Nakata K, Hidaka K. Decadal-scale variability in the Kuroshio marine ecosystem in winter. *Fisheries Oceanography.* 2003; 12: 234-244.
- Nakayama T, Watanabe S, Mitsui K, Uchida H, Inouye I. The phylogenetic relationship between the *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18SrDNA sequence data. *J Phycol.* 1996; 44: 47-55.
- Nakazawa A, Kokubun Y, Matsuura H, Yonezawa N, Kose R, Yoshida M, Tanabe Y, Kusuda E, ThangDV, Ueda M, Honda D, Mahakhant A, Kaya K, Watanabe MM. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *J. Appl. Phycol.* 2014; 26: 29-41.
- Nakazawa A, Matsuura H, Kose R, Ito K, Ueda M, Honda D, Inouye I, Kaya K, Watanabe MM. Optimization of biomass and fatty acid production by *Aurantiochytrium* sp. strain 4W-1b. *Procedia Environ Sci.* 2012a; 15: 27-33.

Nakazawa A, Matsuura H, Kose R, Kato S, Honda D, Inouye I, Kaya K, Watanabe MM. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresour. Technol.* 2012b; 109: 287-291.

Ohno M, Okano I, Watsuji T, Kakinuma T, Ueda K, Beppu T. Establishing the independent culture of a strictly symbiotic bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from its supporting Bacillus strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63: 1083-1090.

Pan J, Del Campo J, Keeling PJ. Reference Tree and Environmental Sequence Diversity of Labyrinthulomycetes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2017; 64: 88-96.

Patterson DJ. Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective. In: Green JC, Leadbeater BSC, Diver WI, editors. *The chromophyte algae: problems and perspectives*, Systematics Association Special 38. Oxford: Clarendon Press; 1989. pp. 357-379.

Pearson WR, Wood T, Zhang Z, Miller W. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics.* 1997; 46: 24-36.

Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A. New approach using the real-time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS One.* 2011; 6(3): e17699.

Perkins FO. Observations of thraustochytriaceous (Phycomycetes) and labyrinthulid (Rhizopodea) ectoplasmic nets on natural and artificial substrates—an electron microscope study. *Can. J. Bot.* 1973; 51: 485-491.

Perkins FO. The ultrastructure of holdfasts, "rhizoids", and "slime tracks" in Thraustochytriaceous fungi and *Labyrinthula* spp. *Arch. Microbiol.* 1972;84: 95-118.

Pesant S, Not F, Picheral M, Kandels-Lewis S, Le Bescot N, Gorsky G, Iudicone D, Karsenti E, Speich S, Troublé R, Dimier C, Searson S; Tara Oceans Consortium Coordinators. Open science resources for the discovery and analysis of Tara Oceans data. *Sci Data*. 2015; 2:150023. doi: 10.1038/sdata.2015.23. eCollection 2015.

Pokorny KS. *Labyrinthula*. *J. Protozool.* 1967; 14: 697-708.

Polglase JL. A preliminary report on the thraustochytrid(s) and labyrinthurid(s) associated with a pathological condition in lesser octopus *Eledone cirrhosa*. *Bot. Mar.* 1980; 23: 699-706.

Pomeroy LR, Williams PJI, Azam F, Hobbie JE. The microbial loop. *Oceanography*. 2007; 20: 28-33.

Porter D. Cell division in the marine slime mold, *Labyrinthula* sp. and the role of the bothrosome in extracellular membrane production. *Protoplasma*. 1972; 74: 427-448.

Porter D. Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ, editors. *Handbook of Protoctista*. Boston, USA: Jones and Bartlett Publishers; 1989. pp. 388-398.

Porter D. Ultrastructure of *Labyrinthula*. *Protoplasma*. 1969; 67: 1-19.

Porter K, Sherr EB, Sherr BF, Pace M, Sanders RW. Protozoa in planktonic food webs. *J Protozool.* 1985; 32: 409-415.

Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 2005; 27: 1179-1187.

- Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*. 2003; 46:48-50.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic. Acids. Res.* 2013; 41: D590-D596.
- Quick JA. A new marine Labyrinthula with unusual locomotion. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1974a; 93: 52-61.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2012.
- Raghukumar C. Fungal parasites of marine algae from *Mandapam* (South India). *Dis. Aquat. Org.* 1987; 3: 137-145.
- Raghukumar C. Fungal parasites of the marine green algae, *Cladophora* and *Rhizoclonium*. *Bot. Mar.* 1987a; 29: 289-297.
- Raghukumar C. Thraustochytrid fungi associated with marine algae. *Indian J. Mar. Sci.* 1986; 15: 121-122.
- Raghukumar S, Raghukumar C. Thraustochytrid fungoid protists in faecal pellets of the tunicate *Pegea confoederata*, their tolerance to deep-sea conditions and implication in degradation processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999; 190: 133-140.
- Raghukumar S, Ramaiah N, Raghukumar C. Dynamics of thraustochytrid protists in the water column of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 2001; 24: 175-186.

Raghukumar S, Schaumann K. An epifluorescence microscopy method for direct detection and enumeration of the fungilike marine protists, the thraustochytrids. *Limnol. Oceanogr.* 1993; 38: 182-187.

Raghukumar S, Sharma S, Raghukumar C, Sathe-Pathak V, Chandramohan D. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora aqiculata* Blume. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994; 183: 113-131.

Raghukumar S. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *Eur. J. Protistol.* 2002; 38: 127-145.

Ralph PJ, Short FT. Impact of the wasting disease pathogen, *Labyrinthula zosterae*, on the photobiology of eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2002; 226: 265-271.

Ren LJ, Zhuang XY, Chen SL, Ji XJ, Huang H. Introduction of  $\omega$ -3 Desaturase Obviously Changed the Fatty Acid Profile and Sterol Content of *Schizochytrium* sp. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 9770-9776.

Renn C E. Demonstration of Labyrinthula parasite in eel-grass from the coast of California. *Science.* 1942; 95: 122.

Russell NJ, Nichols DS. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria--a dogma rewritten. *Microbiology.* 1999; 145: 767-779.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406-425.

Sakaguchi K, Matsuda T, Kobayashi T, Ohara J, Hamaguchi R, Abe E, Nagano N, Hayashi M, Ueda M, Honda D, Okita Y, Taoka Y, Sugimoto S, Okino N, Ito M. Versatile transformation system that is applicable to both multiple transgene

expression and gene targeting for thraustochytrids. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78: 3193-3202.

Sako Y, Hosoi-Tanabe S, Uchida A. Fluorescence in situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catanella*. *J. Phycol.* 2004; 40: 598-605.

Sathe-Pathak V, Raghukumar S, Raghukumar C, Sharma S. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. I - Field studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* J. Ag. *Indian J. Mar. Sci.* 1993; 22: 159-167.

Schärer L, Knoflach D, Vizoso DB, Rieger G, Peintner U. Thraustochytrids as novel parasitic protists of marine free-living flatworms: *Thraustochytrium caudivorum* sp. nov. parasitizes *Macrostomum lignano*. *Mar. Biol.* 2007; 152: 1095-1104.

Sharma S, Raghukumar C, Raghukumar S, Sathe-Pathak V, Chandramohan D. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus II. Laboratory studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* J. Ag. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994; 175: 227-242.

Short FT, Muehlstein LK, Porter D. Eelgrass wasting disease: cause and recurrence of a marine epidemic. *Biol. Bull.* 1987; 173: 557-562.

Short FT, Porter D, Iizumi H, Aoi K. Occurrence of the eelgrass pathogen *Labyrinthula zosterae* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 1993; 16: 73-77.

Siboni N, Rasoulouniriana D, Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Sivan A, Loya Y, Hoegh-Guldberg O, Kushmaro A. Stramenopile microorganisms associated with the massive coral *Favia* sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2010; 57: 236-244.

Sieburth JMN, Smetacek V, Lenz J. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 1978; 23: 1256–1263.

Sime-Ngando T. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. *Front. Microbiol.* 2012; 3: 361. doi: 10.3389/fmicb.2012.00361.

Song X, Zhang X, Guo N, Zhu L, Kuang C. Assessment of marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* OUC88 for mariculture by enriched feeds. *Fisheries Science.* 2007; 73: 565-573.

Sparrow FK. Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. *Biol. Bull.* 1936; 70: 236–63

Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988; 54: 1079-1084.

Steele JH. The structure of marine ecosystems. Harvard University Press. 1974; 128: 1015-1016.

Sterner RW. The role of grazes in phytoplankton succession. *Plankton ecology.* Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg; 1989.

Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones MD, Breiner HW, Richards TA. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Mol. Ecol.* 2010; 19 Suppl 1: 21-31.

Stoeck T, Hayward B, Taylor GT, Varela R, Epstein SS. A multiple PCR-primer approach to access the microeukaryotic diversity in environmental samples. *Protist*. 2006 ;157 :31-43.

Stoeck T, Kasper J, Bunge J, Leslin C, Ilyin V, Epstein S. Protistan diversity in the Arctic: a case of paleoclimate shaping modern biodiversity? *PLoS One*. 2007; 15;2(8): e728.

Stoeck T, Taylor GT, Epstein SS. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69 :5656-5663.

Stokes NA, Ragone Calvo LM, Reece KS, Burreson EM. Molecular diagnostics, field validation, and phylogenetic analysis of Quahog Parasite Unknown (QPX), a pathogen of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Dis. Aquat. Org.* 2002; 52: 233-247.

Takahashi Y, Yoshida M, Inouye I, Watanabe M. *Diplophrys mutabilis* sp. nov., a new member of Labyrinthulomycetes from freshwater habitats. *Protist*. 2014; 165: 50-65.

Takao Y, Mise K, Nagasaki K, Okuno T, Honda D. Complete nucleotide sequence and genome organization of a single-stranded RNA virus infecting the marine fungoid protist *Schizochytrium* sp. *J. Gen. Virol.* 2006; 87: 723-33.

Takao Y, Nagasaki K, Honda D. Squashed ball-like dsDNA virus infecting a marine fungoid protist *Sicyodochytrium minutum* (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes). *Aquat. Microb. Ecol.* 2007b; 49: 101-108.

Takao Y, Nagasaki K, Mise K, Okuno T, Honda D. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA Virus infectious to a marine fungoid protist,

*Schizochytrium* sp. (Thraustochytriaceae, Labyrinthulea). Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 4516-4522.

Takao Y, Tomaru Y, Nagasaki K, Sasakura Y, Yokoyama R, Honda D. Fluorescence in situ hybridization using 18S rRNA-targeted probe for specific detection of thraustochytrids (Labyrinthulomycetes). Plankton Benthos Res. 2007a; 2: 91-97.

Takishita K, Miyake H, Kawato M, Maruyama T. Genetic diversity of microbial eukaryotes in anoxic sediment around fumaroles on a submarine caldera floor based on the small-subunit rDNA phylogeny. Extremophiles. 2005; 9: 185-196.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 1993; 10: 512-526.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011; 28: 2731-2739.

Tanabe AS, Nagai S, Hida K, Yasuike M, Fujiwara A, Nakamura Y, Takano Y, Katakura S. Comparative study of the validity of three regions of the 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community. Mol. Ecol. Resour. 2015; 16: 402-414.

Taniuchi Y, Watanabe T, Kakehi S, Sakami T, Kuwata A. Seasonal dynamics of the phytoplankton community in Sendai Bay, northern Japan. J. Oceanogr. 2017; 73: 1-9.

Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M. Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009; 73: 180-182.

Tice AK, Silberman JD, Walthall AC, Le KN, Spiegel FW, Brown MW. *Sorodiplophrys stercorea*: Another Novel Lineage of Sorocarpic Multicellularity. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2016; 63: 623-628.

Tocher DR. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 2010; 41: 717-732.

Tsui CK, Marshall W, Yokoyama R, Honda D, Lippmeier JC, Craven KD, Peterson PD, Berbee ML. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 50: 129-40.

Ueda M, Nomura Y, Doi K, Nakajima M, Honda D. Seasonal dynamics of culturable thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) in estuarine and coastal waters. *AME.* 2015; 74: 187-204.

Ulken A, Jäckle I, Bahnweg G. Morphology, nutrition and taxonomy of an *Aplanochytrium* sp. from the Sargasso Sea. *Mar. Biol.* 1985; 85: 89-95.

Ulken A. Estimation of thraustochytrid propagules in two mangrove swamps. *Botanica Marina.* 1986; 29: 85-89.

Uye S, Nagano N, Tamaki H. Geographical and seasonal variations in abundance, biomass and estimated production rates of microzooplankton in the Inland Sea of Japan. *J. Oceanogr.* 1996; 52: 689-703.

Uye S, Shimazu T. Geographical and seasonal variations in abundance, biomass and estimated production rates of meso- and macrozooplankton in the Inland Sea of Japan. *J. Oceanogr.* 1997; 53: 529-538.

Valadon LRG. Carotenoids as additional taxonomic characters in fungi: a review. Trans. Br. Mycol. Soc. 1976; 67: 1–15.

Vergeer LHT, den Hartog C. Omnipresence of Labyrinthulaceae in seagrasses. Aquat. Bot. 1994; 48: 1-20.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N, Blagburn BL, Bond R, Denholm I, Dryden MW, Payne P, Rust MK, Schroeder I, Vaughn MB, Bledsoe D. Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. Parasitol. Res. 2004; 94: 219-226.

Watanabe T, Arakawa T, Takeuchi T, Satoh S. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1989a; 55: 1989-1995.

Watanabe T, Izquierdo MS, Takeuchi T, Satoh S, Kitajima C. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. Nippon Suisan Gakkaishi. 1989b; 55: 1635-1640.

Watanabe T, Taniuchi Y, Kakehi S, Sakami T, Kuwata A. Seasonal succession in the diatom community of Sendai Bay, northern Japan, following the 2011 off the Pacific coast of Tohoku earthquake. J. Oceanogr. 2017; 73: 133–144.

Watson SW, Raper KB. *Labyrinthula minuta* n. sp. J. Gen. Microbiol. 1957; 17: 368-377.

Whyte SK, Cawthorn RJ, McGladdery SE. QPX (Quahaug Parasite X), a pathogen of northern quahaug *Mercenaria mercenaria* from the Gulf of St. Lawrence, Canada. Dis. Aquat. Org. 1994; 19: 129-136.

Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 3741-3751.

Wong MKM, Vrijmoed LLP, Au DWT. Abundance of thraustochytrids on fallen decaying leaves of *Kandelia candel* and mangrove sediments in Futian National Nature Reserve, China. *Bot. Mar.* 2005; 48: 374-378.

Yamada M, Otsubo M, Kodama M, Yamamoto K, Nishikawa K, Ichimi K, Tada K, Harrison PJ. Species composition of *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in planktonic and resting-stage cells in Osaka and Tokyo Bays. 2014; 9: 168-175.

Yamamoto K, Tsujimura H, Nakajima M, Harrison PJ. Flushing rate and salinity may control the blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in a river/estuary in Osaka Bay, Japan. *J. Oceanogr.* 2013; 69: 727-736.

Yamaoka Y, Carmona ML, Oota S. Growth and carotenoid production of *Thraustochytrium* sp. CHN-1 cultured under superbright red and blue light-emitting diodes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004; 68: 1594-1597.

Yamasaki T, Aki T, Mori Y, Yamamoto T, Shinozaki M, Kawamoto S, Ono K. Nutritional enrichment of larval fish feed with thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acids and xanthophylls. *J Biosci Bioeng.* 2007; 104 :200-206.

Yan J, Cheng R, Lin X, You S, Li K, Rong H, Ma Y. Overexpression of acetyl-CoA synthetase increased the biomass and fatty acid proportion in microalga *Schizochytrium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97: 1933-1939.

Yang EJ, Kang HK, Yoo S, Hyun J. Contribution of auto- and heterotrophic protozoa to the diet of copepods in the Ulleung Basin, East Sea/Japan Sea. *J. Plankton Res.* 2009; 31: 647-659.

Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T. Optimization of docosaheanoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 49: 72-76.

Yokoyama R, Honda D. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 2007; 48: 199-211.

Yokoyama R, Salleh B, Honda D. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium* and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience*. 2007; 48: 329-341.

Yongmanitchai W, Ward O. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 1989; 24: 117-125.

Yoshimatsu T, Imoto H, Hayashi M, Toda K, Yoshimura K. Preliminary results in improving essential fatty acids enrichment of rotifer cultured in high density. *Hydrobiologia*. 1997; 358: 153-157.

Zhu F, Massana R, Not F, Marie D, Vaultot D. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005; 52: 79-92.

Zhukova NV, Aizdaicher NA. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*. 1995; 39: 351-356.

Zuendorf A, Bunge J, Behnke A, Barger KJ, Stoeck T. Diversity estimates of microeukaryotes below the chemocline of the anoxic Mariager Fjord, Denmark. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006; 58: 476-491.

Bennett RM, Honda D, Beakes GW, Thines M. Labyrinthulomycetes. *Handbook of the Protists*. second edition. Volume 1. 2017; 507-542.

Paul R. Pinet (2010) 海洋学 原著 第 4 版 東海大学出版会

Raghukumar S. *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi*. 2017. Springer

高尾 祥丈 (2005) ヤブレッツボカビ類に感染するウイルスの生理・生態および分子生物学的研究 甲南大学大学院 自然科学研究科 博士学位論文

高尾 祥丈 (2016) ラビリントチュラ類の生態学的多様性 海洋と生物 222; 18-22

笹倉 侑香里 (2004) ラビリントチュラ類を特異的に染色する FISH 法の開発 甲南大学 工学部 生物学科 卒業論文

上田 真由美, 野村 友佳, 土井 耕作, 中嶋 昌紀, 本多 大輔 (2016) ラビリントチュラ類の多様性と生態学的役割 海洋と生物 222; 5-11

上田 真由美 (2011) 沿岸域におけるラビリントチュラ類の現存量と構成属の季節変動 甲南大学大学院 自然科学研究科 修士論文

上田 真由美 (2015) 海洋におけるヤブレッツボカビ類の季節変動に関する生態学的研究 甲南大学大学院 自然科学研究科 博士学位論文

谷口 旭 (2008) 海洋プランクトン生態学 成山堂書店

中井 亮佑, 長沼 毅 (2016) 自然環境におけるラビリントウ類の予想外の多様性 海洋と生物 222; 12-17

北條 浩彦 (2008) 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 羊土社

本多 大輔 (2001) ラビリントウ類の系統と分類 海洋と生物 132; 7-18

木暮一啓 (2006) 海洋の生物の連鎖 生命は海でどう連鎖しているか 東海大学出版会

關 文威 (2005) 生物海洋学入門 第2版 講談社サイエンティフィック

土井 耕作 (2017) ラビリントウ綱ヤブレッツボカビ科の属と種に関する分類学的研究 甲南大学大学院 自然科学研究科 博士学位論文