

多摩川河口域における水生菌類の多様性と有機物分解機能の評価

2020年

鏡味麻衣子

横浜国立大学大学院環境情報研究院・教授

共同研究者

三木 健

龍谷大学理工学部・教授

目次

- 1 はじめに
 - 1.1 真菌類とは
 - 1.2 水域生態系における真菌類の存在
 - 1.3 本研究の目的
- 2 多摩川下流域における真菌類の組成および有機物分解能の評価
 - 2.1 方法
 - 2.1.1 調査
 - 2.1.2 単離培養・顕微鏡観察・DNA 解析
 - 2.1.3 DNA メタバーコーディング
 - 2.1.4 バイオログプレート
 - 2.2 結果と考察
 - 2.2.1 検出された真菌類
 - 2.2.2 真菌類の群集組成
 - 2.2.3 有機物利用特性
- 3 多摩川河口域から東京湾にかけての真菌類の多様性と環境要因との関係
 - 3.1 方法
 - 3.1.1 調査
 - 3.1.2 DNA メタバーコーディング
 - 3.1.3 環境要因測定
 - 3.2 結果と考察
 - 3.2.1 真菌類の群集組成
 - 3.2.2 環境要因との関係
- 4 まとめと今後の課題
- 5 謝辞
- 6 引用文献

1 はじめに

1.1 真菌類とは

真菌類とは、真核生物のなかで菌類界に属するカビやキノコ、酵母の仲間の総称である。細胞が糸状に連なった菌糸を持つカビ、肉眼で見ることのできる子実体を形成するキノコは、単細胞で出芽により増殖する酵母などが含まれる。その分け方は見た目と生活史からわけられたもので、分類が反映されたものではない。分類学的には、真菌類は地球上に 320-380 万種存在すると推定されており、大きく子囊菌門、担子菌門、ツボカビ門に分類される(Hawksworth and Lücking 2018)。高等菌類である子囊菌門、担子菌門は真菌類の大部分を占め、キノコ、カビ、酵母を含む。一方、下等菌類であるツボカビ門は最も祖先的なグループであり、鞭毛をもち水中を泳ぐ遊走子を形成するカビである(James et al. 2006)。

真菌類は、地球上のあらゆるところに存在し、生態系において重要な役割を果たす(Harms et al. 2011; Nilsson et al. 2019)。とくに陸上生態系では真菌類はセルロースやキチン、リグニンなどの植物由来の難分解性有機物も容易に分解できるため、生態系における主要な分解者として重要視されている。このように生物の死骸や堆積した有機物を分解する腐生菌にくわえ、生きた生物から栄養源を吸収する寄生菌や病原菌、生物の体内に生息する内生菌や植物と共生する菌根菌など、様々な役割を担うことが知られている。

1.2 水域生態系における真菌類の存在

陸上生態系では真菌類が重要視されている一方、湖沼や海洋など水域には真菌類はほとんど存在せず、有機物分解は主にバクテリア（細菌類）が行っていると考えられてきた。2000 年以降の分子生物学的手法の急速な発展により、湖沼や海洋にも多様な真菌類が存在することが明らかになった。ただし、DNA で検出される多くの真菌類は存在形態すら不明であり、ダークマター(Dark Matter Fungi)と称されている (Grossart et al. 2016)。真菌類は陸上生態系においてセルロースやキチン、リグニンなどの植物由来の難分解性有機物も容易に分解できることを加味すると、水域においてもバクテリアには分解できない汚濁汚染物質を分解している可能性が高い。実際、湖沼に流入した花粉はバクテリアには分解できないが、ツボカビが分解し、それを動物プランクトンが利用することが明らかになった(Kagami et al. 2017)。

また、河川の上流域では、陸上由来の落ち葉や倒木などの有機物負荷が顕著であり、その分解に真菌類（主に不完全菌類と称される子囊菌と担子菌）が重要な役割を担っていることが知られている(Allan and Castillo 2007)。真菌類が落ち葉や倒木など大型有機物(CPOM)を分解し細くなった有機物(FPOM)は、水生昆虫の餌となるとともに、下流域への有機物供給ともなる。しかし、下流域や河口域での真菌類の群集組成は検討されておらず、有機物の分解過程における真菌類の役割についても明らかにはなっていない(Grossart et al. 2019)。

1.3 本研究の目的

多摩川においても上流域では、陸上由来の落ち葉や倒木などの有機物負荷が顕著であり、その分解には菌類（主に不完全菌類と称される子囊菌門、担子菌門）が重要な役割を担っていることが明らかになってきた（佐藤 2018 年度とうきゅう環境財団研究助成報告書）。一方、下流域など有機物が水中に蓄積するような淀みにおける有機物の分解過程についてはほとんど調べられてこなかった。そこで本研究では、多摩川下流から東京湾にかけて、真菌類の多様性と有機物分解に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

多摩川の下流において真菌類が存在することすら不明であるため、まず1) 多摩川下流域における真菌類の組成と有機物分解能について評価した。真菌類の組成を把握するために瀬と淵、バイオフィームなど異なる生息環境から試料を採取し比較した。同時に、真菌類が分解できる有機物を評価する方法として、バイオログ法(Miki et al. 2018)の有効性について検討した。次に、2) 多摩川河口域から東京湾にかけて真菌類の組成を明らかにし、有機物組成や環境要因との関係を検討した

DNA 解析により把握する菌類の多様性と有機物分解能とを結びつけることで、生物多様性と生態系機能の関係を明確にし、河川中の有機物分解に果たす菌類の役割を評価し、多摩川の汚染汚濁問題の防除に繋げることを目標とした。

2. 多摩川下流域における真菌類の組成および有機物分解能の評価

2.1 方法

2.1.1 調査

調査は多摩川の二子玉川公園付近の河岸 (35.606193, 139.632331)にて (図 1) 2018 年 11 月 5 日および 2019 年 7 月 19 日に行った。2018 年 11 月は①淵 (礫、流れあり)、②瀬 (本流)、③淀みの 3 つの異なる環境で水質を測定し、河川水を採取した。2019 年 7 月は大雨直後の調査で、2018 年 11 月に調査した地点 (①淵と③淀み) はいずれも水没していた。また水は非常に濁っていた。そこで①瀬 (本流) と②淵 (淀み) において、水質を測定し、河川水 (表層 0.5m) を採取した。また①瀬の底石上のバイオフィルムを歯ブラシで剥ぎ取り試料とした。

2.1.2 単離培養・顕微鏡観察

採取した河川水の一部を用いて、菌類の群集組成を把握するために寒天培地を用いた培養をおこなった。河川水を少量寒天培地に撒いて、2-4 日間経過を追った。なお培地は PmTG 培地に抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を入れたものを用いた。確認できた菌類のうち、水生菌類と思われるコロニーを単離し、DNA 解析により同定した。DNA 解析は Hot Shot 法を用いて DNA を抽出し (Ishida et al. 2015)、真菌類特異的なプライマーセット、LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') および LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (Hopple and Vilgalys 1999) にて LSU 領域を PCR 増幅し、サンガー法 (FASMAC 社外注) により解析した。シーケンスの結果を NCBI データベースにて相同性を検索し同定した。

採集した試料は光学顕微鏡 (OLYMPUS 社 IX71) で観察し、確認できる範囲で出現種を把握した。

2.1.3 DNA メタバーコーディング

DNA 解析用の試料を作成した。2018 年は各地点の河川水を 200-300ml、0.2 μ m 孔径のメンブレンフィルターにろ過し、凍結保存した。2019 年は各試料を 100-500ml、0.2 μ m 孔径の Sterivex フィルターに濾過し、アルコールを入れ常温で保存した。

フィルターから DNeasy Blood Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、真菌類特異的なプライマーセット、ITS1-F-KYO2 (5'-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3') および ITS2-KYO2 (5'-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3') (Toju et al. 2012) にて ITS1 領域を PCR 増幅し、Illumina Miseq により解析した。得られた配列は Cladient (Tanabe and Toju 2013) により解析し、NCBI データベースにて相同性を検索し同定した (DNA 解析は兵庫県立大学松岡俊将博士にご協力いただいた) (Matsuoka et al. 2019)。優占した OTU について FUNGuild データベース (Nguyen et al. 2016) を用いて生態系における機能を推定した

2.1.4 バイオログプレート

現場にいる真菌類群集の基質利用特性を具体的に把握するために、本研究では、**BIOLOG** 社の開発した菌類用のマイクロプレート（FFプレート）を用いる予定であった(バイオログ社ホームページ <https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>)。これは難分解性有機物を含む合計 95 種類もの多様な炭素基質が充填されたもので、微生物が用いると発色するように設計されており、その場にいる微生物群集の基質分解能を評価できる。しかし、使用する予定であった菌類用のマイクロプレート（FFプレート）に、輸入の許可が取得していなかった物質が含まれていたことから、2018 年度以降の購入が不可能となった。代替のプレートをいくつか検討した結果、酵母用のプレート（YTプレート）を用いることが有効であるとの結論に至った。そこで2019年7月に採取した試料（①瀬（本流））を用いてFFプレートおよびYTプレートでの発色パターンを比較・評価した。河川水を100 μ l ずつ各ウェルに分注し18 $^{\circ}$ Cで培養、4日目と6日目の発色をプレートリーダー(BioRad社)で測定した。FFプレートは波長490nm, YTプレートは波長590nmで測定し、いずれも波長750nmで測定した濁度を差し引いた値を用いた。



図1 多摩川の二子玉川公園の河岸調査地 (35.606193, 139.632331)

2.2 結果と考察

2.2.1 検出された真菌類：単離培養・顕微鏡観察・DNA 解析

2018年11月は淵①の試料を1ml、淀み③の試料を0.5mlをPmTG培地に撒き4日間培養したところ、いずれの試料についても菌類のコロニーが多数出現した(図2)。水中にも十分な菌がいることが判明した。コロニーの形状から菌糸が確認できる糸状菌類(主に子囊菌)や、酵母(子囊菌や担子菌)が確認できた。コロニーの多くは空気中にも菌糸を広げるもので、陸域由来の可能性が高い。

淀み③では藻類が繁茂していた。そこで藻類を採取するとともに、菌類が付着しているような落ち葉や落枝、石を採取し、観察した。淀みに繁茂していた藻類を観察したところ、珪藻類の *Melosira* や緑藻類の *Staurastrum* などが見つかった。これらの藻類に寄生菌がいる可能性が出てきた。

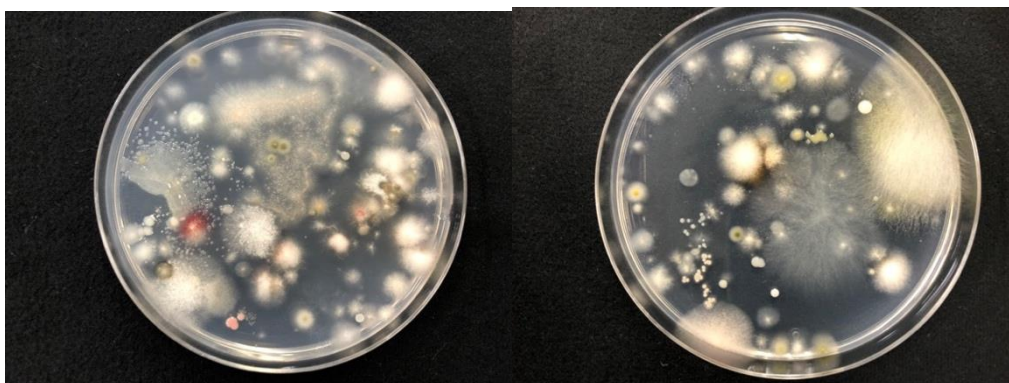


図2 2018年11月多摩川の淵①から採取した河川水1ml(左)、もしくは淀み③の河川水0.5ml(右)を寒天培地(PmTG)に巻いて4日間培養したもの

2019年7月は瀬(本流)①と淵(淀み)②および瀬の底石上のバイオフィルム①-2から採取した試料をpmTG培地に分量に段階をつけて塗布した。瀬①と淵②は20 μ l, 100 μ l, 500 μ l塗布したところ、20 μ lでも十分なコロニー数が得られ、500 μ lではコロニー同士が重なり計数が困難なほどであった(図3,4)。バイオフィルム①-2は白金耳で少量もしくは20 μ l塗布したが、いずれもコロニーが得られ、20 μ lでより多様な形状のものが見られた(図5)。以上の結果を踏まえると、いずれの地点においても20 μ l中に多様な菌類が高密度で生息していることがあきらかになった。

そのうち、瀬①で確認できた酵母状の菌類(写真図3中央)を単離し(TmF1901株)、DNA(LSU領域)をPCR増幅しサンガー法にてシーケンス解析した(プライマーはLR0RとLR5を使用した)。Blastの結果、子囊菌類の1種 *Torula ficus* および *T. herbarum* と100%一致した。*Torula ficus* は主に陸上の植物中に生息する分解性の菌類であり、*T. herbarum* は一般には土壌中に酵母として存在するとされているが地中海の海綿から単離されている。陸域由来か河川水中に生息しているものかは判断できなかった。



図3 2019年7月多摩川の瀬①から採取した河川水を20 μ l(左)、100 μ l(中央)もしくは500 μ l(右)塗布し4日間培養したもの



図4 2019年7月多摩川の淵②から採取した河川水を20 μ l(左)、100 μ l(中央)もしくは500 μ l(右)塗布し4日間培養したもの

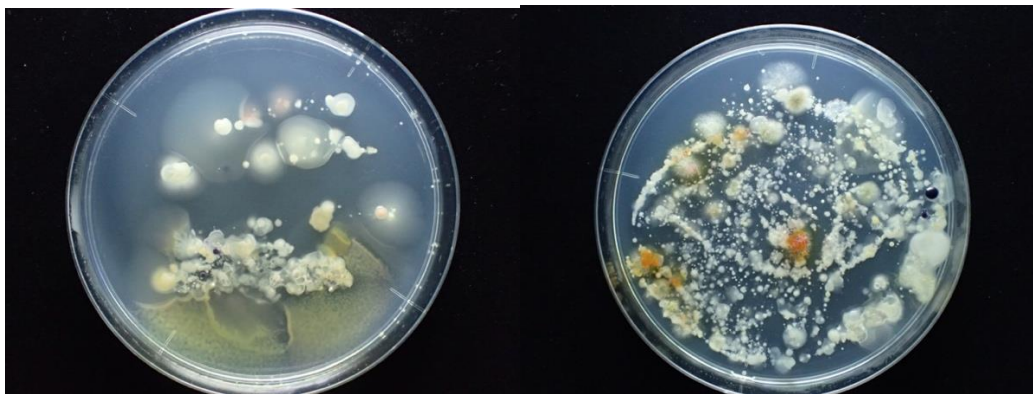


図5 2019年7月多摩川の瀬の底石上に形成されたバイオフィルム①-2を歯ブラシで剥ぎ取り河川水に混ぜたものを白金耳で塗布(左上)もしくは20 μ l塗布(右上)し4日間培養したもの

2.2.2 真菌類の群集組成 (DNA メタバーコーディング)

瀬の表層水①、瀬の底石上に形成されたバイオフィルム①-2 および淵の表層水②では、子嚢菌と担子菌が卓越的に出現しケカビやツボカビも検出された。瀬①の表層水では同定できない菌(未同定 Unidentified)が多く出現した (図 6)。

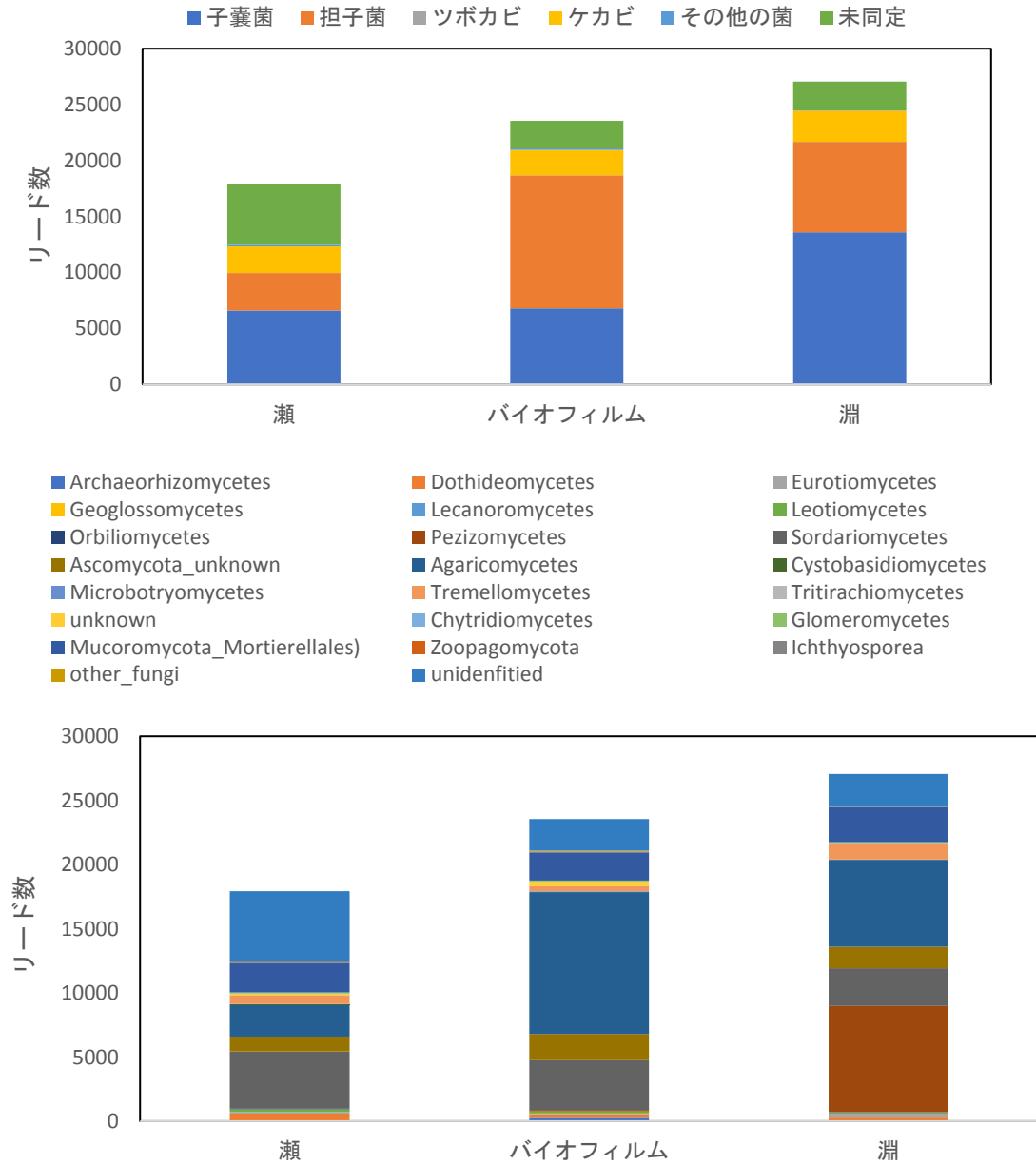


図 6 2019 年 7 月多摩川の瀬の表層水①、瀬の底石上に形成されたバイオフィルム①-2 および淵の表層水②にから検出された真菌類の群集組成 (門レベル (上) と目レベル (下))

今回の調査は長期的な大雨の直後であり、陸域に生息したものが大雨により河川水中に流出し混在している可能性が高い。実際、淵の表層水②で最も多く出現したのは子囊菌チャワタケ目 (Pezizomycetes) *Wilcoxina* 属の1種と、担子菌ハラタケ目

(Agaricomycetes) *Amphinema* 属の1種で、いずれも陸上植物の根に共生する外生菌根菌である (図 6, Tedersoo, May, & Smith, 2010)。瀬のバイオフィーム①—2上では担子菌ハラタケ目 (Agaricomycetes) の1種 *Cuphophyllus flavipes* が優占した。この種は腐生性もしくは共生性とされ、主に陸域から報告されているが(Lodge et al. 2014)、詳細な生態はわかっていない。水域のバイオフィーム内に存在し、有機物を分解しているのかもしれない。

瀬の表層水①では同定できなかった菌が1種、担子菌ハラタケ目 (Agaricomycetes) の菌が1種優占した。これらの種の生態は FunGuild にも登録がなく不明であり、淵の表層水②やバイオフィーム①—2からはほとんど検出されていない。河川水中に生息する水生菌類か、上流から流されてきた菌類の可能性が高い。

多様性 (Shannon の多様度指数) は瀬①の表層水で最も高くなり(3.99)、ついで瀬の底石上のバイオフィーム①—2 (3.12) と淵②の水 (2.96) となった。瀬①では検出された種数も最も多く (図 7 左)、多くの種が比較的均等に出現していることが示唆された。いずれの群集も似ていなかったことから (図 7 右)、場所ごとに特有の異なる群集が形成されていたと推察された。

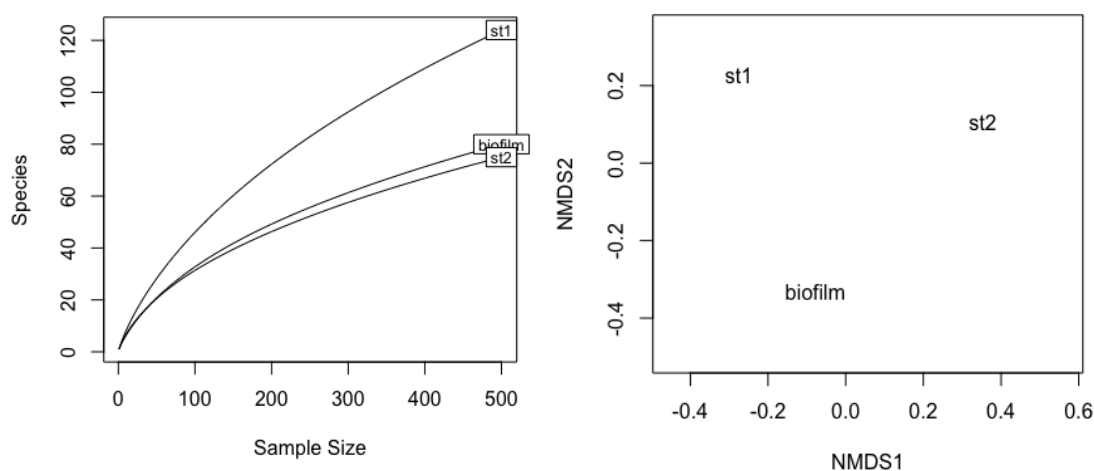


図 7 2019 年 7 月多摩川の瀬の表層水①(st1)、瀬の底石上に形成されたバイオフィーム①—2 (biofilm) および淵の表層水②(st2)における希釈化曲線 (左) および真菌群集各 OTU リード数に基づく NMDS 解析結果 (右)

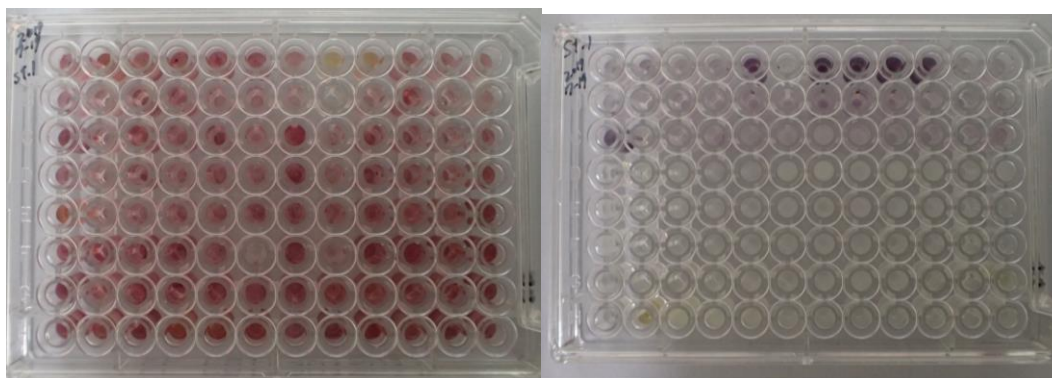
2.2.3 真菌類の有機物利用特性（バイオログプレート）

2019年7月多摩川の瀬の表層水①をFFプレートおよびYTプレートに撒き培養したところ、4日目まで十分な発色が見られた（図8）。

FFプレートの発色から、4日間の培養ではN-Acetyl-β-D-Mannosamine(A5), D-Xylose(E12)とγ-Aminobutyric Acid(F1)が、4日目から6日目の2日間ではSedoheptulosan(E3)やD-Tagatose(E8)が顕著に消費されていた（図9）。他の基質についても発色が比較的多く認められ、様々な有機物が消費されたと考えられる。

YTプレートについては、4日間の培養でL-Aspartic Acid(A7), L-Glutamic Acid(A8), L-Proline(A9), D-Gluconic Acid(A10), N-Acetyl-D-Glucosamine(C1)が顕著に酸化され、4日目からの2日間ではD-Raffinose(B8), Stachyose (B9)が酸化されていた。他の基質についてはほとんど発色が見られず、利用されなかったと考えられた（図10）。

今回の河川水には真菌類だけでなく細菌類（バクテリア）も存在しており、基質の利用に影響した可能性はあるが、河川水100μlでも十分に菌類群集の基質利用特性を検討できることが明らかとなった。今後は抗生物質などを添加しバクテリア有無での条件で発色パターンを比較することで、真菌類と細菌類の基質利用特性について明らかにできるだろう。



A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Water	Aspartic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
D-Cellobiose	D-Cellobiose	Maltose	Maltotriose	D-Melibiose	Palatinose	D-Raffinose	Stachyose	Sucrose	D-Trehalose	Turanose	
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
N-Acetyl-D-Mannosamine	α-D-Glucose	D-Galactose	D-Fructose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
D-Xylose	Sabin	Sedoheptulosan	D-Sorbitol	L-Tagatose	Stachyose	Sucrose	D-Tagatose	D-Turanose	Turanose	Xylitol	D-Xylose
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
γ-Aminobutyric Acid	Glutamic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Water	Aspartic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Water	Aspartic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
D-Cellobiose	D-Cellobiose	Maltose	Maltotriose	D-Melibiose	Palatinose	D-Raffinose	Stachyose	Sucrose	D-Trehalose	Turanose	
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
N-Acetyl-D-Mannosamine	α-D-Glucose	D-Galactose	D-Fructose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose	α-D-Glucose
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
D-Xylose	Sabin	Sedoheptulosan	D-Sorbitol	L-Tagatose	Stachyose	Sucrose	D-Tagatose	D-Turanose	Turanose	Xylitol	D-Xylose
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
γ-Aminobutyric Acid	Glutamic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Water	Aspartic Acid	Formic Acid	Pyruvic Acid	Succinic Acid	Glucuronic Acid	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Cellobiose

図8 2019年7月多摩川の瀬の表層水①をFFプレート（左上）およびYTプレート（右上）に撒き4日間培養した時の発色パターン。各プレートの穴には異なる基質が充填されている。FFプレート（左下）およびYTプレート（右下）（バイオログ社ホームページ <https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>)

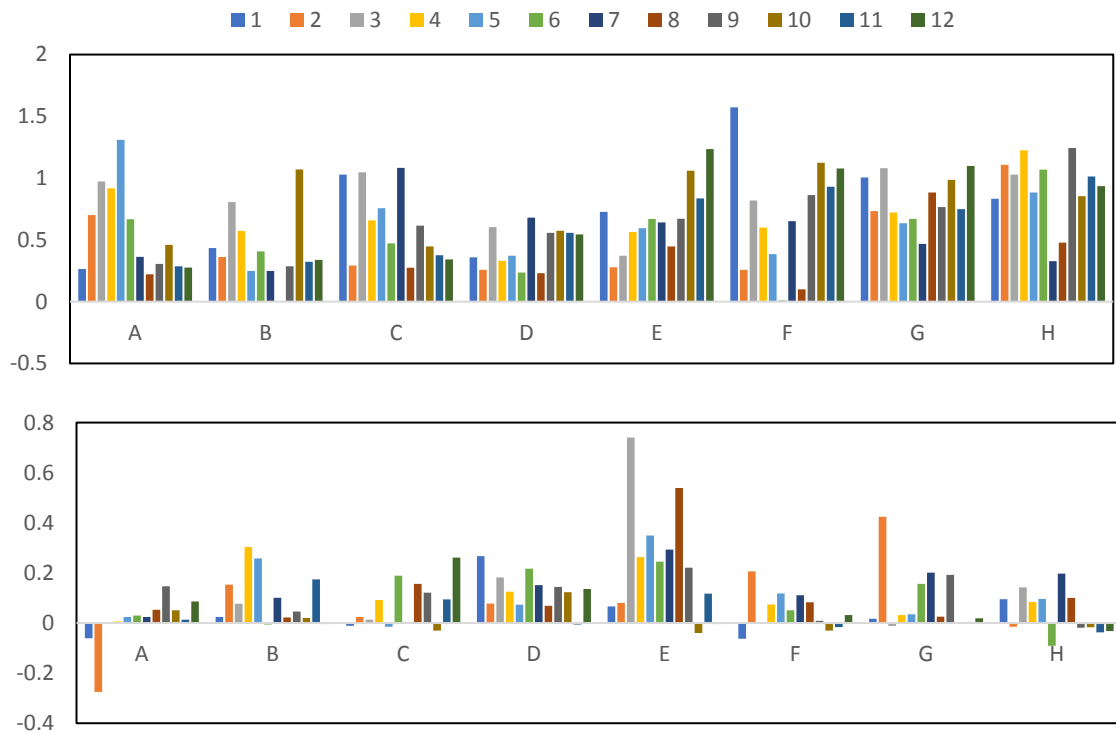


図9 瀬の表層水①をFFプレートに撒き4日間培養した時の発色強度（上）と6日目と4日目の発色強度の差（下）。数字1~12はウェルの列、A~Hは行である。

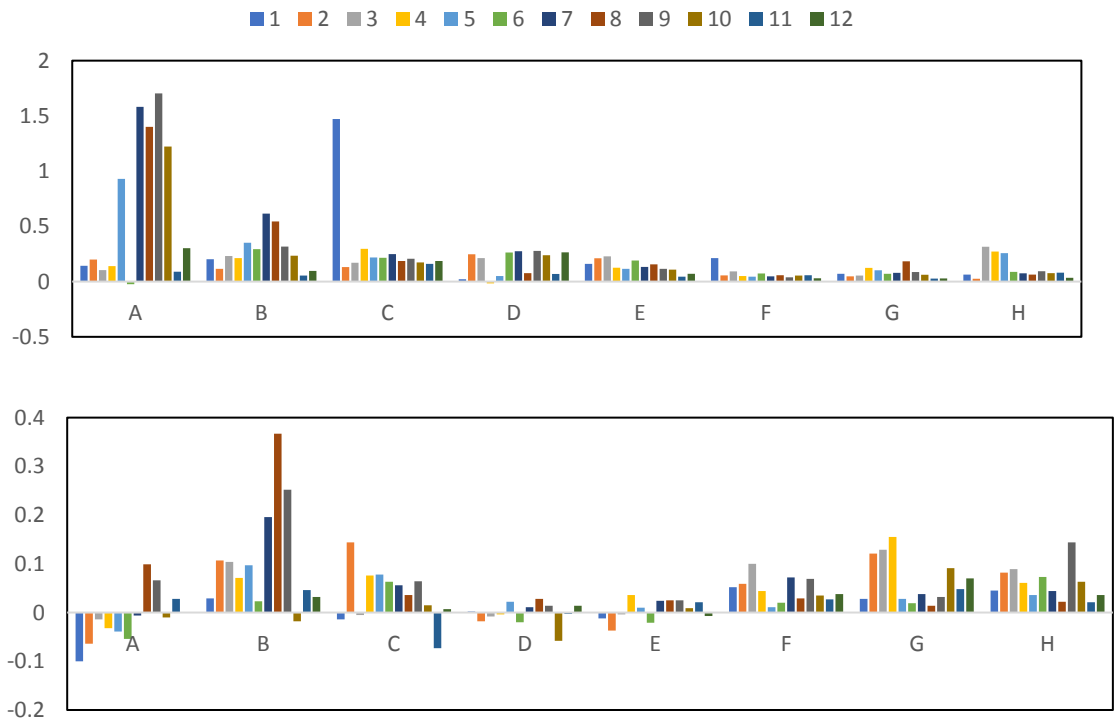


図10 瀬の表層水①をFFプレートに撒き4日間培養した時の発色強度（上）と6日目と4日目の発色強度の差（下）。数字1~12はウェルの列、A~Hは行である。

3. 多摩川河口域から東京湾にかけての真菌類の多様性と環境要因との関係

3.1 方法

3.1.1 調査

多摩川中流域から東京湾にかけてのライントランセクト調査を2019年9月に予定していた。しかし、2019年9月の台風15号および2019年10月の台風19号により調査が困難となった。特に台風19号により多摩川も氾濫し、調査地点(図1)付近は堤防未整備区間から堤防を越えた区域まで浸水した。そこで、本研究では2013年4月4日、6月17日、7月29日、9月12日に多摩川河口域から東京湾奥部にかけて11地点(図11)で採取した試料を用いて、解析をおこなった。

バンドン採水器を用いて、4月は深度3mの海水を、6月以降は深度2.5mの海水を採取した。同時にマルチ水質チェッカー(株式会社堀場製作所 U-50シリーズ)を用いて、表層から10mまで1mおきに、温度、pH、溶存酸素、塩分濃度を測定した。採取した海水は、ポリタンク(4L)に入れて、保冷剤の入ったクーラーボックスに保管し、研究室に持ち帰った。



図11 東京湾調査地点 全11地点

持ち帰った海水は、真菌類の DNA 解析のために海水を 200-300ml、0.2 μ m 孔径のメンブレンフィルターにろ過し、-80°Cで凍結保存した。全窒素と全リンの分析のために、11 地点分の海水をそれぞれ 100ml ずつポリビンに入れて分析まで冷凍保存した。栄養塩分析（アンモニア態窒素・亜硝酸態窒素・硝酸態窒素・リン酸態リン・溶存態有機リン）のための試料は、熱処理した GF/F フィルターで濾過をし、濾過海水 100ml を用い、ポリビンに入れて分析するまで冷凍保存した。採取した海水をそのまま用いてクロロフィル蛍光値の測定を行った。測定には蛍光光度計（TURNER 製）を用いた。

3.1.2 DNAメタバーコーディング

フィルターに捕集された生物のDNAをISOFEAL Beads Beating（ニッポンジーン）により抽出した。抽出したDNAのLSU領域を真菌類に特異的なプライマーセットLR3R（5'-GTCTTGAAACACGGACC-3'）と LR5（5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3'）(Rehner and Samuels 1995, Tedersoo et al. 2015)を用いてPCR法により増幅し、Illumina Miseqにより解析した。得られた配列は(QIIME, ver. 1.9.0) (Caporaso et al. 2010)を用いてOTUを作成し、Ribosomal Database Projectのデータベースを用いて系統推定した（解析は生物技研に委託した）。

3.1.3 環境要因測定

全窒素の分析はペルオキシ 二硫酸カリウム分解・吸光光度法により行い、全リンの分析にはペルオキシ二硫酸カリウム分解・モリブデン青法により行った。リンと窒素をそれぞれ以下の方法で測定した。アンモニア態窒素：インドフェノール法、亜硝酸態窒素：BR 法、硝酸態窒素：硫酸ヒドラジニウム法、リン酸態リン：モリブデン青法、溶存有機リン：ペルオキシ二硫酸カリウム分解法により行った。

DNA 解析により明らかとなった真菌類群集組成を用いて、調査日や地点間の差をPCoA 解析により検定した。また各サンプル間の群集の類似度に基づく非計量多次元尺度法(NMDS)による序列化をおこない、環境要因との関係を解析した。全ての解析はRStudio(ver.1.1.456)を用いておこなった。

3.2 結果と考察

3.2.1 真菌類の群集組成

真菌類の群集組成は月によって有意に異なった。7月は担子菌類が多かったが、6月と9月は子囊菌類、4月は未同定の菌が比較的多くの割合を占めた(図12)。地点による差は検出されなかったが、同じ月でも地点により群集が異なる傾向が見られた。特に9月は多摩川沖(St.3)から湾中央にかけて子囊菌の割合が減少し、未同定の菌が増加、多様度指数も増加した。一方、4月は多摩川沖(St.3)から湾中央にかけて未同定の割合が減少し、担子菌の割合が増加、多様度指数は減少した。

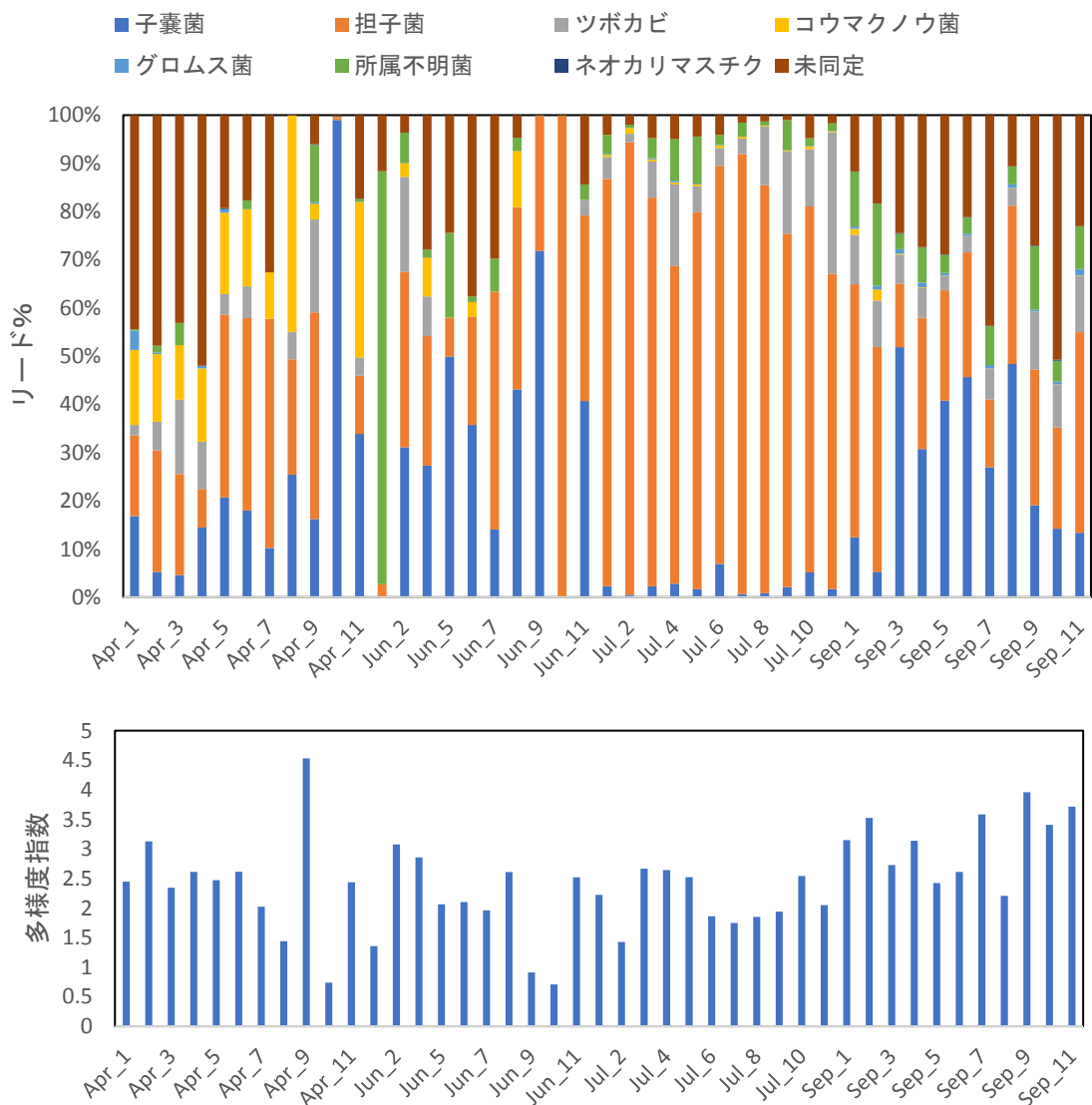


図12 4月(Apr)、6月(Jun)、7月(Jul)、9月(Sep)の11地点における各菌類門のリード数の割合(上)と多様度指数(下)。

3.2.2 環境要因との関係

4月から7月にかけて水温は上昇し、7月が平均25℃と最も高かった(図13)。全月を通して、水深2.5mの地点間における温度差はほとんどなかった。4月は表層から底までの温度変化がほとんどなかったのに対し、6月と7月、9月は水温躍層が形成され表層から底まで温度変化が見られた。

塩分濃度はいずれの月においても、東京都から千葉に向けて高くなる傾向が見られた(図13)。また湾中央部のSt.5と6で最も高く、30を超えた。夏場(7月や9月)では多摩川沖(St.3)で塩分濃度が24と低くなった。台風による多摩川からの淡水の流入量の増加によるものかもしれない。

溶存酸素濃度は4月に高く、6月以降は千葉沖(St.10)で低くなる傾向が見られた。

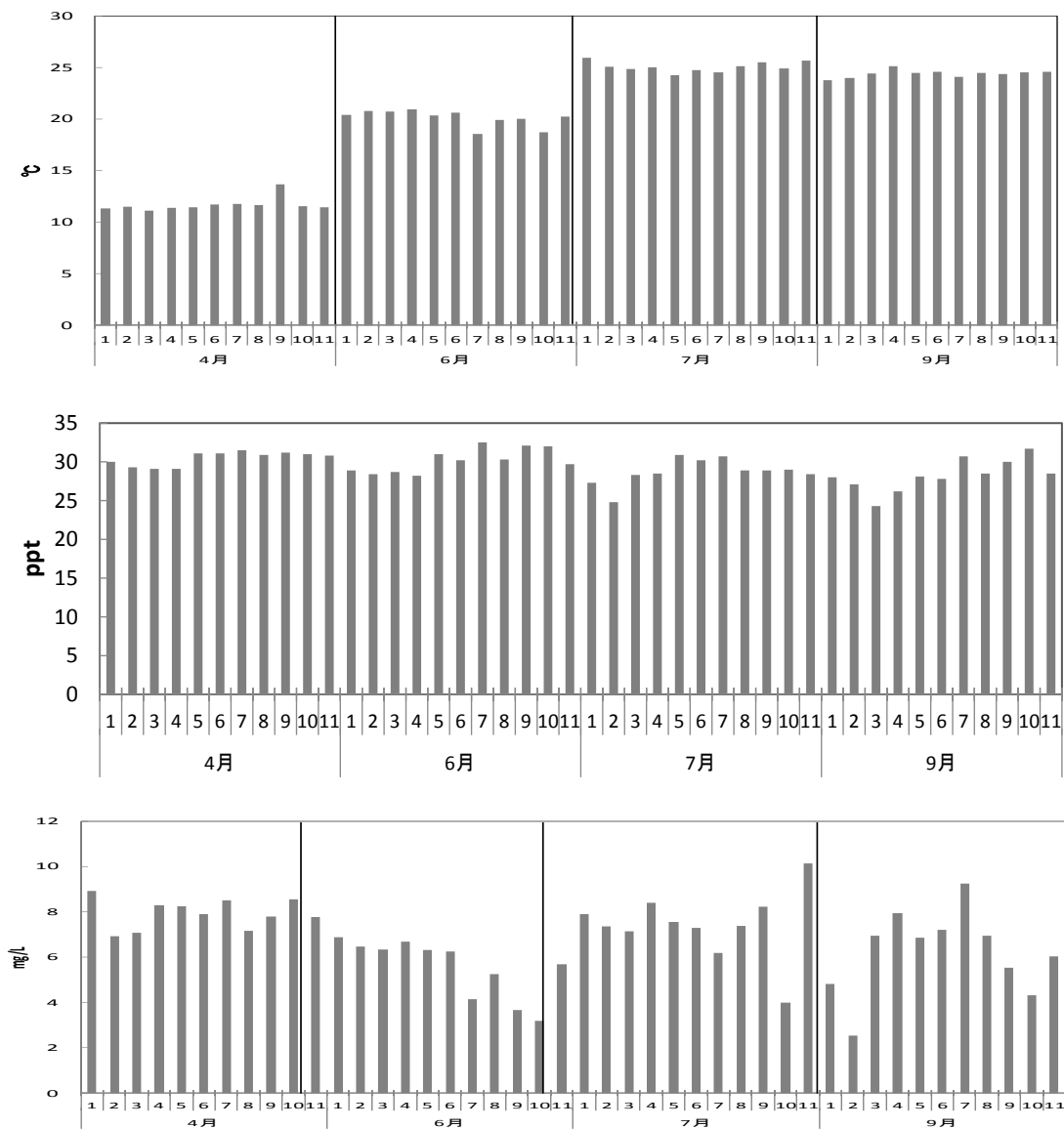


図13 調査月ごとの11地点における水深2.5mの水温(上)、塩分濃度(中)、溶存酸素濃度(下)

全窒素 (TN) 濃度は、4月は全地点で低かったが、6月以降局所的に高い値をとった (図 14)。特に東京都側の河川流入域 (St. 3, 4) や湾中央部 (St. 5, 7) で高くなった。全リン (TP) 濃度は、TN と同様に4月は低かったが、6月以降は東京都側の地点 (St. 2, 3, 4) や千葉港付近 (St. 10, 11) で高くなり、その傾向は TP とは必ずしも一致しなかった。

溶存態無機窒素 (DIN) 濃度は、4月で最も濃度が高く、硝酸態窒素 NO_3 の割合がほとんどだった (図 14)。6月で濃度は濃度が下がり、亜硝酸態窒素 NO_2 が多くを占めたほとんどになった。7月になるとさらに下がり、最も低い値をとった。9月は全体的に増加し、特に東京都側の地点 (St. 1, 2, 3) で高く、アンモニア態窒素 NH_4 の割合が多かった。溶存態無機リン (DIP) 濃度は、4月、7月、9月は東京都側 (St. 2, 3) は濃度が高いのに対して、6月は千葉県側 (St. 9, 10) が高くなっていた。全月を通して、湾中央部の st5 は低い濃度であった。

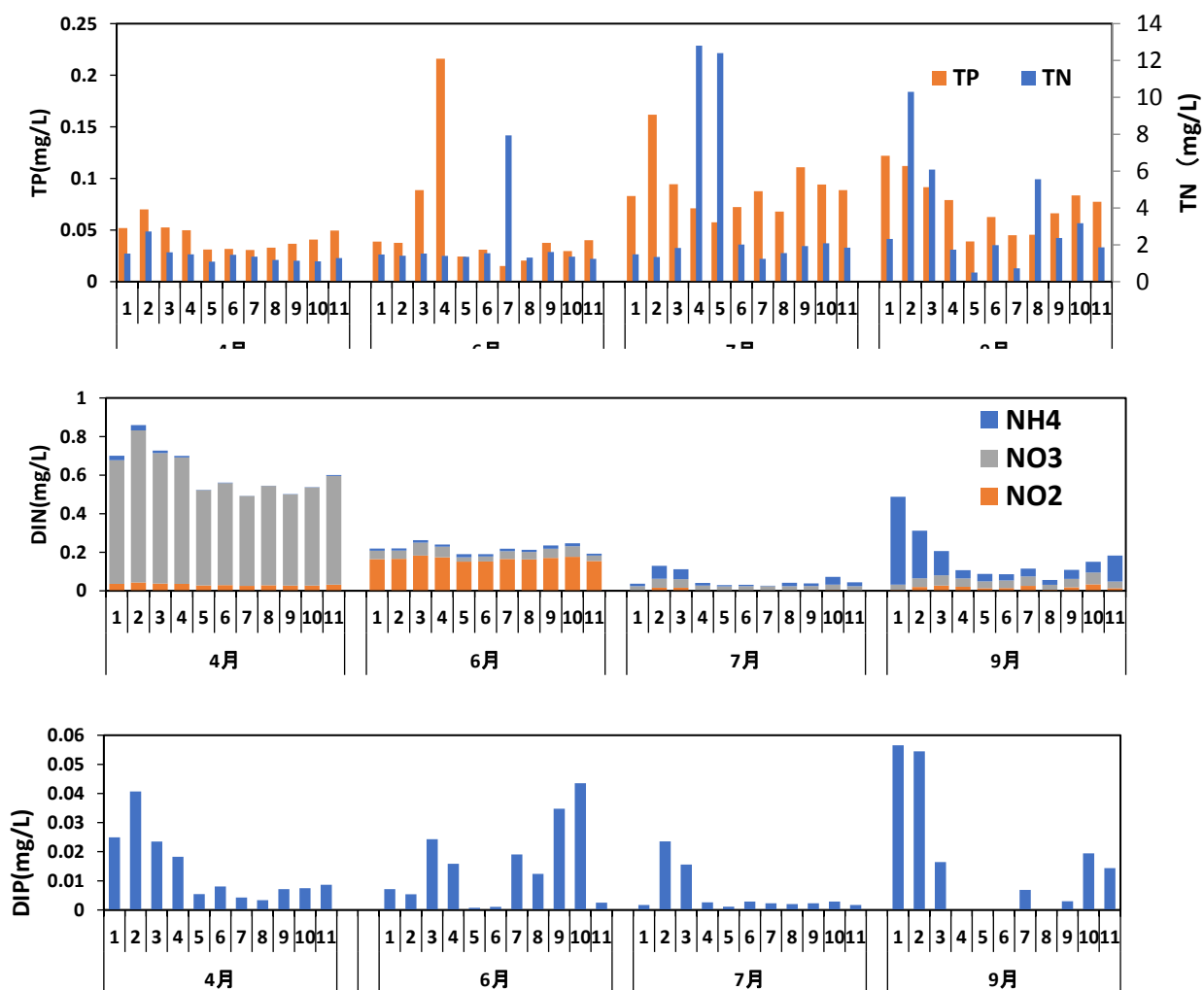


図 14 調査月ごとの 11 地点における全窒素 (TN) および全リン (TP) 濃度 (上)、溶存態無機窒素 (DIN) 濃度と各窒素の割合 (中)、溶存態無機リン (DIP) 濃度

植物プランクトンの量として、クロロフィル a の量を蛍光値として測定した結果、6月が高く、4月が低かった（図 15）。6、7月は湾奥部から湾中央部に向かって低くなる傾向が見られた。7月の植物プランクトン優占種は珪藻類の *Skeletonema* spp. で、次にラフィド藻類の *Heterosigma akashiwo* だった。

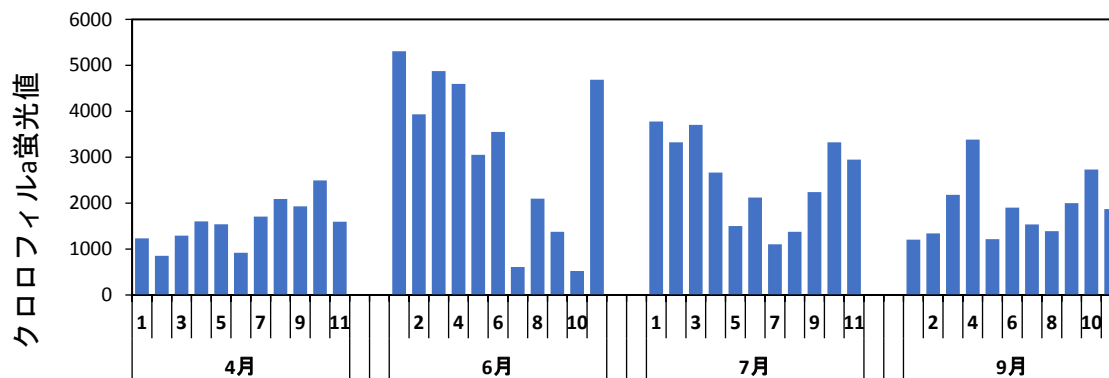


図 15 調査月ごとの 11 地点における水深 2.5m のクロロフィル a 蛍光値

環境要因 8 項目（水温、塩分濃度、溶存酸素濃度、TP, TN, DIN, DIP、クロロフィル蛍光値）、調査月・地点と真菌類の群集組成の関係を調べたところ、水温と調査月、溶存酸素濃度および溶存態窒素濃度(DIN)との有意な関係が得られた（図 16）。DIN 濃度の高かった 4 月や、水温の高い 7 月 9 月にそれぞれ特有の群集構造が形成されていたことを反映した結果であろう。加えて、東京湾は多摩川や荒川、江戸川など流入河川の影響を大きく受ける。夏場の台風による河川水流入とそれに伴う栄養塩負荷は植物プランクトンだけでなく真菌類群集にも大きな影響を与える。さらに河川水が流入することで、陸上由来の菌の割合が増え、水域由来（主に生態が不明な未同定の菌）が減る可能性もある。実際、9 月には多摩川沖(St.3)から湾中央にかけて子囊菌の割合が減少し、未同定の菌が増加しており、窒素濃度や塩分濃度の変化とも同様の傾向であった。

以上を踏まえると、東京湾の真菌類の群集組成は、水温や栄養塩など環境要因が水生菌類に直接的に影響を与えた結果だけでなく、植物プランクトンなど有機物の組成を介しても間接的に影響を受け、さらには河川水の流入に伴う陸上由来の菌類の混入を反映していることを示唆している。

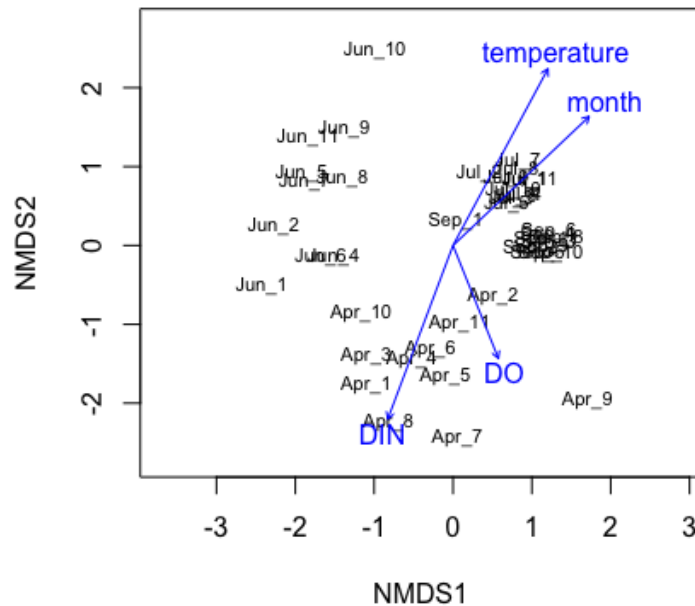


図 16 各調査月 11 地点の真菌類群集の類似度に基づく非計量多次元尺度法(NMDS)による序列化と環境要因との関係。

4. まとめと今後の課題

本研究により多摩川の下流から東京湾にかけて多様な真菌類が存在することが明らかになった。瀬や淵とバイオフィームといった局所的な環境によっても群集組成が異なった。流れのある瀬の表層水中にも多様な真菌類が高密度で存在し、様々な有機物を分解する特性を有することが判明した。これら真菌類の多くは DNA データベースに未登録で生態が不明な菌(Dark Matter Fungi)であったことを踏まえると、河川下流に特有の水生菌類が生息している可能性が高い。今後はこれら河川水中に生息する Dark Matter Fungi を単離し基質利用特性など基礎情報を収集するとともに、DNA データベースを充実させることで、河川の有機物分解および物質循環に果たす真菌類の役割を明らかにすることができる。真菌類の一部は農薬や医薬品を分解する特性も有することからバイオレメディエーション（生物学的環境修復）にも活用されている (Grossart et al. 2019)。河川に存在する正体不明の菌が有害物質を分解できる可能性は高く、今後より詳細な研究を進めることで多摩川を始め都市部を流れる大型河川の汚染汚濁問題の解決につながられるだろう。

今回、河川水や海水中から陸域に生息すると考えられる菌も検出された。多摩川下流の淵からは陸上植物と共生する外生菌根菌が最も多く検出された。調査直前の大雨の影響で陸域から大量の流入があったと考えられる。また多摩川河口から東京湾内湾において真菌類群集の組成に勾配が見られ、水温や窒素濃度との関係が検出されたこと

から、夏場の台風による流量の増大とそれに伴う栄養塩負荷は、陸域からの真菌類の流入を促し真菌類群集組成に影響したと推察された。環境 DNA の手法を活用し、河川水中の真菌類 DNA を調べることで陸域の真菌類の組成や分布を把握する試みも始まっている(Matsuoka et al. 2019)。真菌類の生息場所や由来、特に陸域か水域か、人間関連菌か動物病原菌かといった生態情報が充実することで、真菌類を指標として河川水の汚濁源を明らかにし、水質管理や生態系の保全につながられると考えられる。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、助成をいただいた公益財団法人東急財団（旧：公益財団法人とうきゅう環境財団）に深く感謝する。特に2年目は台風による多摩川の氾濫といった大きな災害に伴い、当初計画の続行が困難となったが、臨機応変にご対応いただいた。多摩川の調査は横浜国立大学大学院環境情報研究院の中森准教授をはじめ、研究室のメンバーにご協力いただいた。瀬戸健介博士と仲田崇志博士には菌類の単離培養や同定にもご協力いただいた。多摩川の真菌類 DNA メタバーコーディング解析では、兵庫県立大学の松岡俊将博士に多大なご協力をいただいた。東京湾の調査は東邦大学風呂田利夫名誉教授に大変お世話になるとともに、東邦大学理学部生命圏環境科学科の湖沼生態学研究室のメンバーに協力いただいた。特に平岡武氏と福田有里氏には環境要因の測定や真菌類の DNA 解析でご協力いただいた。東京湾の真菌類 DNA メタバーコーディング解析は、滋賀県立大学の田辺祥子准教授にお世話になった。この場を借りて感謝を申し上げる。

6. 引用文献

- Allan, J. D., and M. M. Castillo. 2007. *Stream Ecology; structure and function of running waters*, Springer Netherlands.
- Grossart, H. P., C. Wurzbacher, T. Y. James, and M. Kagami. 2016. Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. *Fungal Ecol.* **19**: 28–38. doi:10.1016/j.funeco.2015.06.004
- Grossart, H., S. Van den Wyngaert, M. Kagami, C. Wurzbacher, M. Cunliffe, and K. Rojas-Jimenez. 2019. Fungi in aquatic ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 339–354. doi:10.1038/s41579-019-0175-8
- Harms, H., D. Schlosser, and L. Y. Wick. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 177–192. doi:10.1038/nrmicro2519

- Hawksworth, D. L., and R. Lücking. 2018. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. 79–95. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
- Hopple, J. S., and R. Vilgalys. 1999. Phylogenetic Relationships in the Mushroom Genus *Coprinus* and Dark-Spored Allies Based on Sequence Data from the Nuclear Gene Coding for the Large Ribosomal Subunit RNA: Divergent Domains, Outgroups, and Monophyly. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**: 1–19. doi:10.1006/mpev.1999.0634
- Ishida, S., D. Nozaki, H. P. Grossart, and M. Kagami. 2015. Novel basal, fungal lineages from freshwater phytoplankton and lake samples. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 435–441. doi:10.1111/1758-2229.12268
- James, T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, and others. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818–822. doi:10.1038/nature05110
- Kagami, M., Y. Motoki, H. Masclaux, and A. Bec. 2017. Carbon and nutrients of indigestible pollen are transferred to zooplankton by chytrid fungi. *Freshw. Biol.* **62**. doi:10.1111/fwb.12916
- Lodge, D. J., M. Padamsee, P. B. Matheny, and others. 2014. Molecular phylogeny, morphology, pigment chemistry and ecology in *Hygrophoraceae* (Agaricales). *Fungal Divers.* **64**: 1–99. doi:10.1007/s13225-013-0259-0
- Matsuoka, S., Y. Sugiyama, H. Sato, I. Katano, K. Harada, and H. Doi. 2019. Spatial structure of fungal DNA assemblages revealed with eDNA metabarcoding in a forest river network in western Japan. 37–47. doi:10.3897/mbmg.3.36335
- Miki, T., T. Yokokawa, P. Ke, I. Hsieh, C. Hsieh, T. Kume, K. Yoneya, and K. Matsui. 2018. Statistical recipe for quantifying microbial functional diversity from EcoPlate metabolic profiling. 249–260. doi:10.1007/s11284-017-1554-0
- Nguyen, N. H., Z. Song, S. T. Bates, S. Branco, L. Tedersoo, J. Menke, J. S. Schilling, and P. G. Kennedy. 2016. FUNGuild : An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* **20**: 241–248. doi:10.1016/j.funeco.2015.06.006
- Nilsson, R. H., S. Anslan, M. Bahram, C. Wurzbacher, P. Baldrian, and L. Tedersoo. 2019. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 95–109. doi:10.1038/s41579-018-0116-y
- Tanabe, A. S., and H. Toju. 2013. Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0076910

- Tedersoo, L., T. W. May, and M. E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**: 217–263. doi:10.1007/s00572-009-0274-x
- Toju, H., A. S. Tanabe, S. Yamamoto, and H. Sato. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One* **7**. doi:10.1371/journal.pone.0040863

多摩川河口域における水生菌類の多様性と有機物分解機能の評価

(研究助成・学術研究 VOL. 49—NO. 346)

著 者 鏡味 麻衣子

発行日 2020年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>