

平成30年6月26日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07580

研究課題名(和文) シャットネラ細胞糖被膜の魚毒性因子としての多面的生化学的解析

研究課題名(英文) Possible toxic factors in the glycocalyx of *Chattonella*

研究代表者

小田 達也 (ODA, Tatsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：60145307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シャットネラ細胞表面は粘性多糖体である糖被膜(グリコカリックス)で覆われており、活性酸素産生酵素(NADPH oxidase)が局在する事、糖被膜はシャットネラが魚鰓を通過する際、離脱し、鰓表面に付着する事から、鰓表面での持続的活性酸素産生が鰓機能に障害を与え、魚を窒息死させるとの推論に至っている。本研究では糖被膜に存在する酵素蛋白質や粘性多糖体について解析している。1985年に鹿児島湾で分離され、それ以後研究室で継代培養されているシャットネラ株と2010年に島原半島で分離されたシャットネラ株では魚毒性が著しく異なり、島原株は活性酸素産生能が高く、より強い魚毒性を示す事を見出している。

研究成果の概要(英文)：We compared the fish-killing activities of *Chattonella marina* isolated in 1985 and *Chattonella antiqua* isolated in 2010. Nearly 100% of the fish species died within a few hours exposure to *C. antiqua* at 10,000 cells/ml, whereas no dead fish were observed even 24 h after initial exposure to *C. marina* at 10,000 cells/ml. Chemiluminescence and electron spin resonance (ESR) analyses suggested greater reactive oxygen species (ROS)-producing activity of *C. antiqua* than of *C. marina*. These results suggest that the ROS-producing activity and affinity of *Chattonella* cells to the gill surface may be important factors for the fish-killing activity. We also investigated the effects of two strains of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* (SUO-1 and FUK) on the rotifer. The strain SUO-1 showed highly toxic effect on rotifer, whereas the strain FUK showed obviously lower toxicity. The cell suspension of SUO-1 showed a hemolytic activity toward horse erythrocytes, but FUK did not.

研究分野：海洋生物化学

キーワード：赤潮 微細藻類 毒性 活性酸素 溶血毒素 シャットネラ カレニア ラフィド藻類

### 1. 研究開始当初の背景

赤潮原因微細藻類の一種で、ラフィド藻類に分類されているシャットネラは強い魚毒性を示す事が知られており、日本で頻発する赤潮の原因有害赤潮プランクトン種である。これまでの本研究室での解析から、シャットネラは高レベルの活性酸素を通常の培養条件下において常に産生する特性を有することを見出している。また、シャットネラは強固な細胞壁を持たず、セルロースを主体とした殻構造も無いが、細胞表面は粘性多糖体である糖被膜(グリコキリックス)で覆われており、この部分に活性酸素産生酵素系(ほ乳類白血球の NADPH oxidase に類似していると推定)が局在する事、糖被膜はシャットネラが魚鰓を通過する際、細胞本体から離脱し、鰓表面に付着する事から、鰓表面での持続的活性酸素産生が鰓機能に障害を与え、魚を窒息死させるとの推論に至っている。

### 2. 研究の目的

シャットネラの強い魚毒性発現における活性酸素関与の更なる検証が必要である他、植物プランクトンであるシャットネラの活性酸素産生機構やその生化学的意義については未だ不明である。これらの点を解明することを目的として、本研究では糖被膜に存在する酵素蛋白質、さらに、未だ実態が不明な粘性多糖体について多面的に解析を継続している。

### 3. 研究の方法

これまでの研究により1985年に鹿児島湾で分離され、それ以後研究室で継代培養されているシャットネラ株と2010年に島原半島で分離されたシャットネラ株では、魚毒性が著しく異なり、島原株は活性酸素産生能が高く、より強い魚毒性を示す事を見出している。これら分離場所と分離時期が異なるシャットネラ株を用い、マダイ稚魚への曝露実験を実施し、両株の魚毒性の相違が確認された。両シャットネラ株の活性酸素産生能に関しては活性酸素特異的の化学発光試薬によるケミルミネッセンス法により明らかにする事ができた。さらに、活性酸素検出法として最も信頼性が高い電子スピン共鳴(ESR)法によっても両株の活性酸素産生能の違いを確認できた。一方、多くの赤潮プランクトンの毒性因子として知られている溶血毒素に関して、ウサギ赤血球を用いたマイクロプレートアッセイにより、両株で解析した結果、両株とも顕著な溶血活性は検出されなかった。一方、二枚貝に強い毒性を示す赤潮プランクトンで、渦鞭毛藻類に属するヘテロカプサは強い溶血活性を示す事を見出している。近年、九州沿岸で赤潮原因となっている渦鞭毛藻類に属するカレニア種は魚類及び貝類両方に強い毒性を示す。最近の研究でカレニア種

は溶血活性の他、活性酸素産生能が見出された。これらの知見から、溶血毒素は主に二枚貝毒性因子として、活性酸素は魚毒性因子として作用するとも考えられる。

### 4. 研究成果

前年度までの研究により、2010年に島原半島で分離された *C. antiqua* と1985年に鹿児島湾で分離され、その後本研究室の培養装置内で継代培養された *C. marina* の魚毒性は大きく異なり、*C. marina* に比べ *C. antiqua* はより強い魚毒性を示すことを見出している。両シャットネラ種の活性酸素産生やその他の推定される毒性因子の多面的比較検討を継続している。前年度における解析では、*C. marina* に比べ明らかに *C. antiqua* がより強い活性酸素産生能を示していたが、本年度における比較研究ではほぼ同程度の活性を示す結果が得られている。*C. antiqua* も *C. marina* と同様、自然界から分離されてすでに5年以上経過している事から、人工的環境下での継続的培養により、その活性酸素産生能も低下してきたと推定される。この事はシャットネラ種の活性酸素産生の生物学的意義を考える上で重要な知見と考えられる。

一方、有害有毒赤潮プランクトン数種の毒性因子として知られている、溶血毒素の有無について両シャットネラ株について調べた結果、いずれの株においても溶血活性は検出されなかった。同時期の解析ではシャットネラ種以外の有害有毒赤潮プランクトン数種において顕著な溶血活性が検出された。従って、シャットネラ種は他の赤潮プランクトン種とは異なる特異的毒性機構を有すると推定された。さらに、シャットネラ以外の赤潮プランクトン種の活性酸素産生レベルはシャットネラに比べ著しく低かった事から、活性酸素産生はシャットネラに特異的的生物学的特徴と推定された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計24件)

(1) Mikinori Ueno, Kichul Cho, Tomoki Nishiguchi, Kenichi Yamaguchi, Daekyung Kim, and Tatsuya Oda. Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyrin (isolated from *Porphyra yezoensis*) on RANKL induced differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts. *Phytotherapy Research* 32 (3), 452-458 (2017).

査読有り

(2) Kichul Cho, Li Wencheng, Satoshi Takeshita, Jung-Kil Seo, Young-Ho Chung, Daekyung Kim, [Tatsuya Oda](#). Evidence for the presence of cell-surface-bound and intracellular bactericidal toxins in the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Toxicology* 189, 209-215 (2017). 査読有り

(3) Mikinori Ueno, Kichul Cho, Narumi Hirata, Kenji Yamashita, Kenichi Yamaguchi, [Daekyung Kim](#), and [Tatsuya Oda](#). Macrophage-stimulating activities of newly isolated complex polysaccharides from *Parachlorella kessleri* strain KNK-A001. *International Journal of Biological Macromolecules* 104,400-406 (2017). 査読有り

(4) Tomomitsu Hatakeyama, Ayaka Ichise, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, [Tatsuya Oda](#), Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi, Hitomi Sakai, and Hideyuki Nakagawa. Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-I with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*. *Protein Science*, 26, 1574-1583 (2017). 査読有り

(5) Mikinori Ueno, Tomoki Nishiguchi, Satoshi Takeshita, Kenichi Yamaguchi, and [Tatsuya Oda](#). Effects of alginate oligomer on the expression of cell cycle- and stress-related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(6), 1254-1260 (2017). 査読有り

(6) Kichul Cho, Takuya Kasaoka, Mikinori Ueno, Leila Basti, Yasuhiro Yamasaki, Daekyung Kim, and [Tatsuya Oda](#). Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. *EUROPEAN*

*JOURNAL OF PHYCOLOGY*, 52 (3), 311-319

(2017). 査読有り

(7) Tomoki Nishiguchi, Kichul Cho, Shogo Isaka, Mikinori Ueno, Jun-O Jin, Kenichi Yamaguchi, Daekyung Kim, [Tatsuya Oda](#). Protective effect of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*) on lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, 1273-1278 (2016). 査読有り

(8) Leila Basti, Kiohito Nagai, Jiyoji Go, Sho Okano, [Tatsuya Oda](#), Yuji Tanaka, Satoshi Nagai: Lethal effects of ichthyotoxic raphidophytes, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, and *Heterosigma akashiwo*, on post-embryonic stages of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Harmful Algae* 59, 112-122 (2016). 査読有り

(9) Tomoki Nishiguchi, Kichul Cho, Masumi Yasutomi, Mikinori Ueno, Kenichi Yamaguchi, Leila Basti, Yasuhiro Yamasaki, Satoshi Takeshita, Daekyung Kim, [Tatsuya Oda](#). Intracellular haemolytic agents of *Heterocapsa circularisquama* exhibit toxic effects on *H. circularisquama* cells themselves and suppress both cell-mediated haemolytic activity and toxicity to rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquatic Toxicology* 179, 95-102 (2016). 査読有り

(10) Mikinori Ueno, Toshiaki Itami, Kenji Yamashita, and [Tatsuya Oda](#). Beneficial effects of dietary supplemented *Parachlorella kessleri* strain KNK-A001 on pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Aquaculture Science* 64 (2), 201-204 (2016). 査読有り

- (11) Leila Basti, Satoshi Nagai, Satoshi Watanabe, Tatsuya Oda, Yuji Tanaka. Neuroenzymatic activity and physiological energetics in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, during short-term sublethal exposure to harmful alga, *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Toxicology* 176, 76-87 (2016). 査読有り
- (12) Kichul Cho, Chi-Heon Lee, Kyungjun Ko, Yeon-Ji Lee, Kil-Nam Kim, Mi-Kyung Kim, Young-Ho Chung, Daekyung Kim, In-Kyu Yeo, Tatsuya Oda. Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Research* 17, 61–66 (2016). 査読有り
- (13) Wei Zhang, Li Xu, Si-Young Cho, Kyung-Jin Min, Tatsuya Oda, LiJun Zhang, Qing Yu, Jun-O Jin. Ginseng berry extract attenuates dextran sodium sulfate-induced acute and chronic colitis. *Nutrients* 8 (4) 199 (2016). 査読有り
- (14) Wei Zhang. Takasi Okimura, Li Xu, Lijun Zhang, Tatsuya Oda, Minseok Kwak, Qing Yu, and Jun-O Jin. Ascophyllan functions as an adjuvant to promote anti-cancer effect by dendritic cell activation. *Oncotarget* 7 (15) 19284-19298 (2016). 査読有り
- (15) Kichul Cho, Jun Sakamoto, Tatsuki Noda, Tomoki Nishiguchi, Mikinori Ueno, Yasuhiro Yamasaki, Motoaki Yagi, Daekyung Kim, and Tatsuya Oda. Comparative studies on the fish-killing activities of *Chattonella marina* isolated in 1985 and *Chattonella antiqua* isolated in 2010, and their possible toxic factors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80 (4), 811-817 (2016). 査読有り
- (16) Satoru Nakazono, Kichul Cho, Shogo Isaka, Ryogo Abu, Takeshi Yokose, Masakazu Murata, Mikinori Ueno, Katsuyasu Tachibana, Kaysuya Hirasaka, Daekyung Kim, Tatsuya Oda. Anti-obesity effects of enzymatically-digested alginate oligomer in mice model fed a high-fat-diet. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 7, 1-8 (2016). 査読有り
- (17) Kichul Cho, Sung-Pyo Hur, Chi-Heon Lee, Kyungjun Ko, Yeon-Ji Lee, Kil-Nam Kim, Moo-Sang Kim, Young-Ho Chung, Daekyung Kim, Tatsuya Oda. Bioflocculation of the oceanic microalga *Dunaliella salina* by the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and its effect on biodiesel properties of the biomass. *Bioresource Technology* 202, 257–261 (2016). 査読有り
- (18) Mikinori Ueno, Kichul Cho, Satoru Nakazono, Shogo Isaka, Ryogo Abu, Satoshi Takeshita, Kenichi Yamaguchi, Daekyung Kim, and Tatsuya Oda. Alginate oligomer induces nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells: elucidation of the underlying intracellular signaling mechanism. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79 (11), 1787-1793 (2015). 査読有り
- (19) Wei Zhang, Tatsuya Oda, Qing Yu and Jun-O Jin: Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Marine Drugs* 13, 1084-1104 (2015). 査読有り
- (20) Ryogo Abu, Zedong Jiang, Mikinori Ueno, Shogo Isaka, Satoru Nakazono, Takasi Okimura, Kichul Cho, Kenichi Yamaguchi, Daekyung Kim, and Tatsuya Oda. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from

*Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma.

*Biochemical and Biophysical Research*

*Communications* 458, 727-732 (2015). 査読有り

(21) Shogo Isaka, Kichul Cho, Satoru Nakazono, Ryogo Abu, Mikinori Ueno, Daekyung Kim, and Tatsuya Oda. Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 68-75 (2015). 査読有り

(22) Hae-Won Lee, Seong Woon Roh, Kichul Cho, Kil-Nam Kim, In-Tae Cha, Kyung June Yim, Hye Seon, Song, Young-Do Nam, Tatsuya Oda, Young-Ho Chung, Soo Jung Kim, Jong-Soon Choi, Daekyung Kim: Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Talanta* 132, 630-634 (2015). 査読有り

(23) Kichul Cho, Kil-Nam Kim, Na-Lae Lim, Moo-Sang Kim, Jeong-Chul Ha, Hyeon Ho Shin, Mi-Kyung Kim, Seong Woon Roh, Daekyung Kim, Tatsuya Oda: Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Biomass & Bioenergy* 72, 1-7 (2015). 査読有り

(24) Youn Hee Choi, Kenichi Yamaguchi, Tatsuya Oda, and Taek Jeong Nam: Chemical and mass spectrometry characterization of the red alga *Pyropia yezoensis* chemoprotective protein (PYP): Protective activity of the N-terminal fragment of PYP1 against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells. *International Journal of Molecular Medicine* 35 (1), 271-276 (2015). 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

(1) Mikinori Ueno, Tomoki Nishiguchi, and

Tatsuya Oda. Comparison of fish-killing activities of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* against three fish species and possible mitigation effect of alginate oligomer on *Chattonella* sp. PICES-2016 Annual Meeting. 25 Years of PICES: Celebrating the Past, Imagining the Future (North Pacific Marine Science Organization). San Diego, USA (November 2-13, 2016).

(2) Mikinori Ueno and Tatsuya Oda. Biological activities of alginate oligosaccharides prepared by enzymatic digestion. 2015 ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR GLYCOBIOLOGY. San Francisco, USA (December 1-4, 2015).

(3) Shogo Isaka, Daekyung Kim and Tatsuya Oda. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF THE SULFATED POLYSACCHARIDE PORPHYRAN ISOLATED FROM DISCOLORED NORI (*PORPHYRA YEZOENSIS*). World Aquaculture 2015. Jeju, Korea (May 26-30, 2015).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田達也 (ODA, Tatsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号: 60145307