

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07886

研究課題名(和文)細胞内遺伝子解析が明らかにする海産有毒微細藻ディノフィシス属の餌料生物

研究課題名(英文)Molecular approach for analysis of in situ feeding by the marine toxic dinoflagellate Dinophysis

研究代表者

西谷 豪(Nishitani, Goh)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70450781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻*Dinophysis rotundata*、*Dinophysis acuminata*、*Dinophysis mitra*の餌料生物を遺伝子解析により種レベルで明らかにした。また、赤潮原因プランクトンである夜光虫*Noctiluca*を対象にし、制限酵素処理法およびblocking primer法の2種類の手法を開発し、夜光虫の餌料生物を解明した。さらに別のプランクトンに本手法を適用した結果、麻痺性貝毒原因プランクトンの*Alexandrium*属において、その細胞内に寄生生物が存在していることが判明し、その寄生生物の種を特定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下痢性貝毒原因プランクトンであるディノフィシスの発生時期を予測できれば、事前に養殖二枚貝の出荷を早める(毒化する前に全て出荷する)ことで被害を抑えられる。いったん貝毒が発生してしまうと、その後数週間から数ヶ月間にわたって貝を出荷できなくなるので、発生予測の意義は大きい。また、プランクトンの分野全般においてこのような手法で餌料解析をしている報告例はほとんどなく、本手法がプランクトンの餌料解析におけるスタンダードになれば、その意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：The food organisms of *Dinophysis rotundata*, *Dinophysis acuminata*, and *Dinophysis mitra* were clarified at the species level by genetic analysis. For *Noctiluca* which is the red tide cause plankton, two kinds of methods of restriction enzyme and blocking primer method were developed, and feed organisms of *Noctiluca* were clarified. As a result of applying this method to another plankton, it was found that a parasite existed in the cell of *Alexandrium* that causing paralytic shellfish poison, and the species of the parasite was successfully identified.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：貝毒 渦鞭毛藻 餌料解析 分子生態

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物である海産有毒プランクトンの *Dinophysis* (以下ディノフィシスと称す) は、二枚貝類の餌となることによって、貝類の毒化を引き起こす。その毒成分には人間に下痢や吐き気をもたらす、発癌を促進させる作用もある。そのため毒化した貝類を出荷できない事例が毎年のように発生し、水産養殖業にとって重要な解決課題となっている。ディノフィシスが毒を生産する原因生物であることは 1980 年にはすでに判明していたのだが、現場海域において毎年どの程度ディノフィシスが発生するかは現在に至るまで予測が困難な状況にある。そのため毎年発生する下痢性貝毒の規模も予測できていない。現在に至るまで毎年のディノフィシスの発生量が予測できない最大の理由として、未だ解明されていない彼らの栄養様式が挙げられる。ディノフィシスは繊毛虫と呼ばれる原生動物を摂食しているようなのだが、現場海域で具体的にどの種類を摂食しているかはまだ特定されていない。その餌の正体を特定することによって、有毒プランクトンの発生メカニズムを解明し、水産養殖業にとって重要な二枚貝類の毒化を未然に防ぐ必要がある。

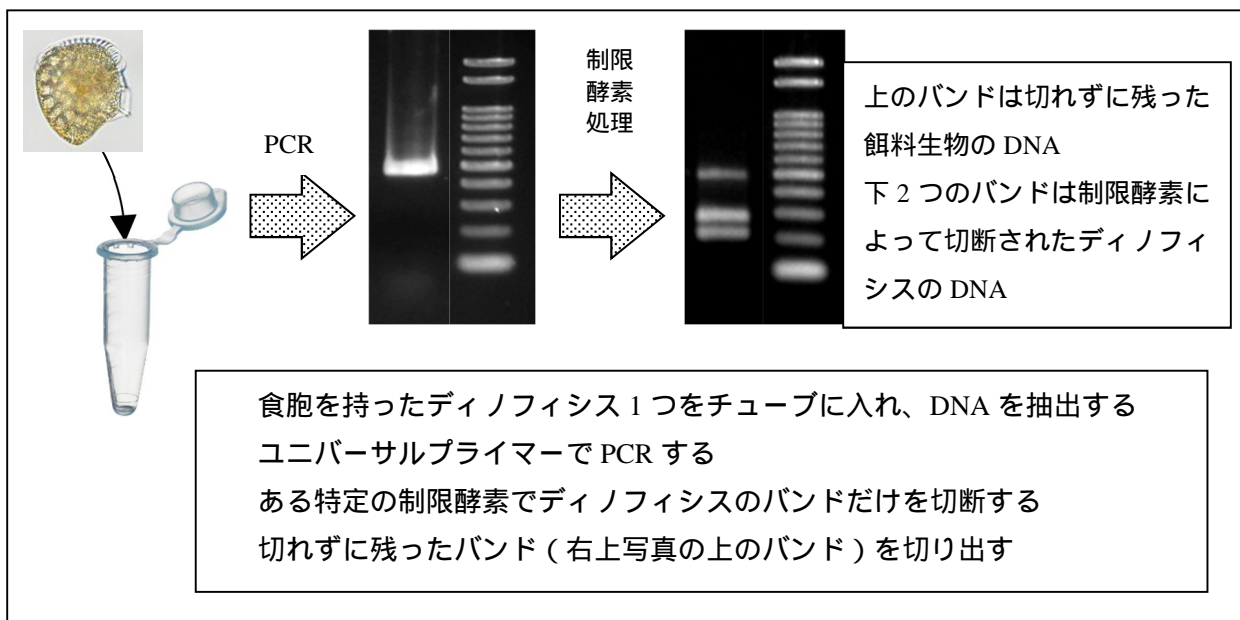
2. 研究の目的

申請者は、ディノフィシスの餌料解析について、すでに手法を確立した状態にある。そこで本研究の目的として、下記の項目を設定した。

- ・ 優占種である *D. acuminata* を日本全国から採取して餌料生物を解析し、同一種でも海域や時期の違いによって餌料の種類が異なっているか
- ・ ディノフィシスの他の有毒種では餌料の種類が異なっているか
- ・ それらの餌料密度が海中でどう変動し、ディノフィシスの発生量にどう影響を与えているか

3. 研究の方法

まず、本研究で使用する手法を下図に示す。



ディノフィシスがこういった種類の餌料を摂食しているか不明であるため、PCRには海産真核微生物すべてを対象にしたユニバーサルプライマーを使用する。当然、ディノフィシス自身のDNAも増幅してしまうため、PCR後のバンドは中央写真のように1本の太いバンドになる。この1本の中にはディノフィシスのDNAも餌料生物のDNAも混在しており、通常はディノフィシス本体のDNAのほうが圧倒的に多いため、この状態のまま遺伝子クローニングを行っても餌料生物のDNAはほとんど検出されない。しかし、申請者はこの状態からディノフィシスのDNAだけを切断する特定の制限酵素を見だし、その処理を行った。その結果、右写真のように2つに切断されたディノフィシスのDNAのみが下部に移動し、元の位置には切断されずに残った比較的微量な餌料生物のDNA(上の薄いバンド)が目視できる。これをアガロースゲルから切り出し、遺伝子クローニングをすることによって、餌料生物のDNAのみを読み取ることが可能とな

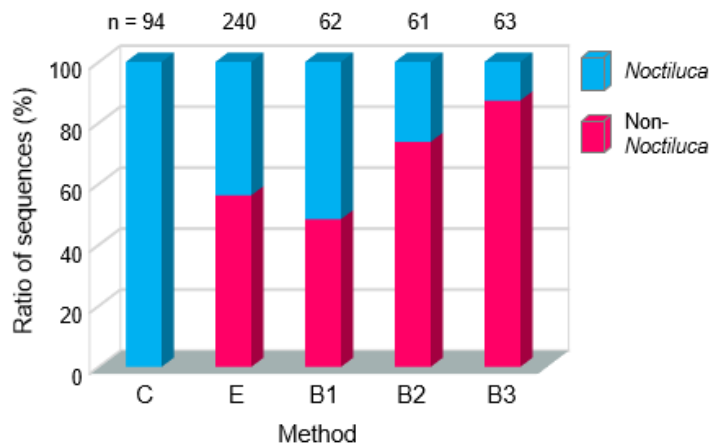
った。

4. 研究成果

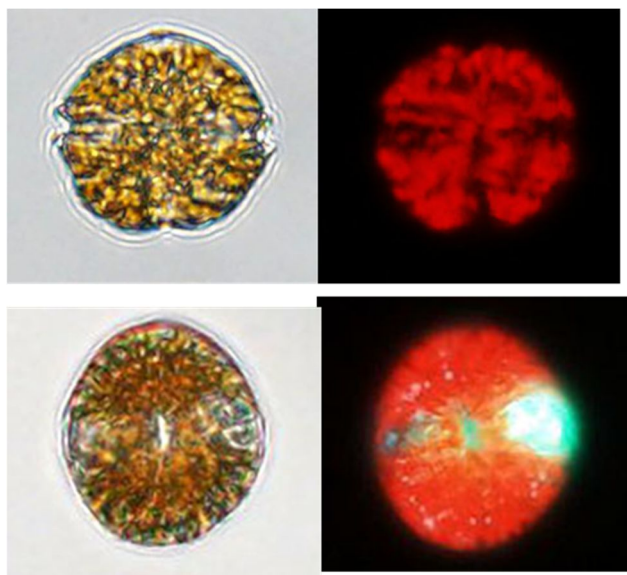
(1)2017 年度に開発したディノフィシス属の餌料解析手法を改良した。これにより、さらに効率良く餌料生物の DNA を検出することが可能となった。この手法を用いて、*Dinophysis rotundata*、*Dinophysis acuminata* の餌生物を遺伝子解析により種レベルで明らかにした。また、新たに特異的プライマー法による餌料解析手法を開発した。これは捕食者の DNA 増幅を抑えながら、餌生物の DNA を増幅させるプライマーである。このプライマー法により、制限酵素時よりもさらに効率良く餌料生物の DNA を検出することが可能となった。上記の両手法を用いて、これまでほとんど知られていなかった *Dinophysis rotundata* の餌生物を遺伝子解析により種レベルで明らかにした。さらに、*Dinophysis mitra* の餌料生物を DNA 解析により明らかにした。右図は、*Dinophysis mitra* (= *P. mitra*) の餌料生物解析結果を示した。B, C, D は単離した細胞、n は解析細胞数を示す。



(2)すでに開発を終えていたディノフィシス属を対象にした餌料解析手法を他の渦鞭毛藻に適用した。従属栄養性渦鞭毛藻である夜光虫 *Noctiluca* を対象にし、制限酵素処理法および blocking primer 法の 2 種類の手法を *Noctiluca* に合うよう再設計した。上記の両手法を用いて、これまでほとんど知られていなかった夜光虫の餌生物を遺伝子解析により種レベルで明らかにした。夜光虫は特定の餌を捕食しているわけではなく、周囲の環境中に存在しているプランクトンを非選択的に取り込んでいることが判明した。右図は、*Noctiluca* の餌料解析結果を示す。C はコントロール、E は制限酵素法による結果、B1 から B3 はブロッキングプライマー法による結果であり、1-3 の数字はプライマーの最終濃度を示す。



(3)本研究で開発した DNA 解析手法を応用し、さらに別の有毒プランクトンに適用した。その結果、麻痺性貝毒原因プランクトンの *Alexandrium* 属において、その細胞内に寄生生物が存在していることが判明し、その寄生生物の種を特定することに成功した。この寄生生物種は、宿主である *Alexandrium* 属を殺滅することがフラスコ内の実験で明らかになり、解析を継続している。右図上段は、非感染細胞、下段は感染細胞を示す。赤色はホストの葉緑体、緑は寄生生物の塊を示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goh Nishitani, Yuki Kosaka, Satoshi Nagai, Yoshihito Takano, Young-Ok Kim, and Akira Ishikawa	4. 巻 13
2. 論文標題 An effective method for detecting prey DNA from marine dinoflagellates belonging to the genera <i>Dinophysis</i> and <i>Phalacrocoma</i> using a combination of PCR and restriction digestion techniques	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 90-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goh Nishitani, Masaomi Shiromoto, Waka Sato-Okoshi, Akira Ishikawa	4. 巻 99
2. 論文標題 Molecular approach for analysis of in situ feeding by the dinoflagellate <i>Noctiluca scintillans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Harmful Algae	6. 最初と最後の頁 101928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goh Nishitani, Mineo Yamaguchi	4. 巻 8
2. 論文標題 Seasonal succession of ciliate <i>Mesodinium</i> spp. with red, green, or mixed plastids and their association with cryptophyte prey	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 輝 (Ishikawa Akira)	三重大学・生物資源学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------