

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07899

研究課題名（和文）有害プランクトン発生の潜在的リスク評価のための休眠細胞定量技術の開発

研究課題名（英文）Development of quantitative detection techniques on harmful algal cyst for assessment of potential risk of harmful algal blooms

研究代表者

坂本 節子（Sakamoto, Setsuko）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・グループ長

研究者番号：40265723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：底泥中の有害プランクトン休眠細胞（シスト）から潜在的な発生リスクを評価するための手法の確立を目指した。定量PCRでの検出定量のためのシストからのDNA抽出条件検討をChattonella属やGymnodinium catenatumを用いて検討し、シストのrDNAを標的配列とした定量方法を確立した。また、休眠や発芽などシスト特有の生理現象の指標となる発現遺伝子を探索し、シストの休眠や発芽への関与が推測される光、温度、酸素ストレス関連遺伝子や陸上植物の種子の休眠や発芽制御関連遺伝子の配列を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、DNAを用いた正確なシストの計数方法を提案するものであり、顕微鏡観察による形態的な種同定が必要であったChattonellaおよびGymnodinium catenatumシストの検出定量を、rDNAのコピー数を基に推定して赤潮発生リスクを評価することを可能にした。また、シストの休眠や発芽への関与が推定される遺伝子マーカー候補となる配列を複数抽出できたことは、今後、単にシストの数ではなく発芽可能なシスト数といった生理状態を把握するための技術開発の基盤となると考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a method for assessing the potential risk of harmful algal blooms based on cysts of harmful algae in the sediments. An accurate quantitative PCR method was investigated using the cyst of harmful algae such as Chattonella spp. and Gymnodinium catenatum, and a quantitative method was established using the rDNA as a target sequence. In addition, expressed genes that could become molecular markers of cyst-specific physiological phenomena such as dormancy and germination were searched for. As results, light, temperature and oxygen stress-related genes which could be involved in cyst dormancy and germination, and the homology gene which related to the control the dormancy and germination of plant seeds. were extracted.

研究分野：水産学一般

キーワード：海洋環境保全 有害有毒プランクトン シスト 定量PCR 赤潮 貝毒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

赤潮や貝毒などの原因となる有害プランクトンの大発生による漁業被害は、沿岸養殖業にとって大きなリスクの一つである。有害プランクトンにはシストを形成する種が複数おり、シードポピュレーションとなって同じ海域で繰り返し発生することも少なくない。したがって、海底泥中のシスト密度やその発芽能力を知ることは、有害プランクトンの潜在的な発生リスクを評価する上で重要な情報となる。しかしながら、シスト密度の把握は検鏡による形態観察、発芽能力を知るには培養による発芽の確認が通常の方法であり、シストの形態に関する高度な知識や観察経験が必要であること、培養実験の結果が出るまでに時間がかかるなど、データを得ることは容易ではない。

近年、有害プランクトンのシスト検出・定量にも定量 PCR 法を応用した事例が報告されているが (Kamikawa et al. 2007)、栄養細胞から得た検量線をそのまま適用してシストを定量している例が多く認められる (Park & Park 2010、出村ほか 2015)。しかし、DNA を標的遺伝子とした定量の場合、栄養細胞とシストの核相が異なることから標的遺伝子コピー数は異なると考えられる。また、シストは栄養細胞とは異なる丈夫なシスト壁を持つことから、抽出法の選択によっては遺伝子抽出効率が変わり、定量結果を大きく左右する可能性がある。

日本沿岸で繰り返し発生している有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* について、出村ほか (2015) は定量 PCR 法によるシストの定量結果について報告し、1) 栄養細胞から得た検量線を適用して定量している、2) 検鏡等によるシスト密度と定量 PCR 法とのデータ整合性の検証はなされていない、といった複数の問題が残されていることを指摘している。

有害プランクトンの生活環特異的遺伝子マーカーについては、*Alexandrium* 属においてシスト形成期に発現が促進される遺伝子マーカーが報告されている (Hosoi-Tanabe et al. 2005)。しかし、シストの休眠や発芽のマーカーとなる遺伝子については研究例がない。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的手法を用いてシストを簡易、高精度に定量する技術を確立し、実環境中の栄養細胞とシストの動態を明らかにすることにより、有害プランクトン発生の潜在的なリスクを評価する手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定量 PCR のためのシストからの遺伝子抽出条件の検討

Chattonella 属シストを用いて定量 PCR で DNA を定量的に検出するための抽出条件を検討した。シストは八代海および瀬戸内海で採泥した試料から顕微鏡下で分離した。DNA 抽出条件については 1) 物理的破碎の効果、2) 化学的 DNA 抽出法の効果、3) 底泥混在の影響について検討した。同様に麻痺性貝毒原因種 *Gymnodinium catenatum* のシストについても検討した。シストは培養株を用いて形成させ、顕微鏡下で分離して用いた。

(2) シストの生理状態を把握するためのマーカーとなる発現遺伝子の探索

シストで発現している遺伝子の全体像をつかむため、平成 23~27 年度の科研費課題「有害渦鞭毛藻シストの休眠および発芽の誘導・制御機構の解明」において *Gymnodinium catenatum* シストの mRNA 網羅的解析により得た発現遺伝子について解析を進めた。得られたコンティグ配列にアノテーションを付加し、Blast 解析による機能推定を行った。休眠や発芽に関与すると推定される温度、酸素、光ストレスに関与する遺伝子、および陸上植物の種子の休眠・発芽に関与することが報告されている遺伝子と相同性の高い配列を探索した。

4. 研究成果

(1) シストからの定量的遺伝子抽出条件の検討

Chattonella 属シストの DNA 抽出には細胞の物理的破碎が有効であり、物理的破碎により安定して DNA が抽出された。底泥が混在しない場合には TE 煮沸法や 5% Chelex 煮沸法 (Nagai et al. 2012) など、非常に簡易な抽出方法でも定量的に安定して DNA を抽出することが可能であった。シスト細胞の DNA コピー数は約 2,700 copies/cell であるのに対し、栄養細胞は約 5,188 copies/cell と算出され、シストの核相が単相 (n)、栄養細胞の核相が複相 (2n) であることと矛盾しないことが確認された。化学的 DNA 抽出法として PCI 法、Protease-K 法、および土壤試料からの DNA 抽出試薬として市販されている ISOIL (ニッポンジーン) で抽出が可能であった。一方、*Alexandrium* 属シストで良好な結果が報告されている CTAB 法 (Kamikawa et al. 2007) では DNA が抽出されず定量 PCR では検出限界以下となった。また、試料に底泥が混在している場合には化学的抽出法を用いても抽出効率が不安定になる (検出されない、あるいは検出感度が低くなる) ことがしばしばあり、市販の DNA 抽出試薬である ISOIL を使用した場合でも安定した抽出方法の確立には至らなかった。

Gymnodinium catenatum シストからの DNA 抽出にも物理的破碎が必要であること、底泥が混在していない場合には 5% Chelex 煮沸法といった簡易な方法で安定的に DNA を抽出できることを

確認した。一方、底泥が混在すると定量 PCR による検出が不安定になる、底泥混在に加えて加熱抽出ではさらに定量 PCR での検出率が低下する、しかし DNA 量を測定すると DNA は抽出できている、ということがわかった。これらのことから抽出液中に混在している何らかの物質が PCR 反応を阻害していることが推察された。分析の結果 *G. catenatum* シストの rDNA コピー数は約 1,900 copies/cell と算出された。Yarimizu et al. (2021) は、*G. catenatum* の栄養細胞の 18S rDNA のコピー数をデジタル PCR を用いて算出した結果 2,150 ~ 3,280 copies/cell であったことを報告している。したがって、定量 PCR で算出されたシストのコピー数はやや多いものの、シストの核相が単相 (n)、栄養細胞が複相 (2n) であることを確認するとともに、シストが定量的に検出できる技術が確立できた。

なお本研究では、試料中に底泥が混在する場合に安定して検出できないという技術的な問題が残された。検討の方向性として、本研究期間中に新たな市販の土壌 DNA 抽出試薬 (例えば DNeasy PowerSoil Kit : Qiagen、Power Soil DNA Isolation kit : MoBio) が海底堆積物中のプランクトンシストの定量 PCR や環境メタゲノム解析などへ適用されるようになった (Gaonkar et al. 2018, Jung et al. 2018) ことが解決への糸口になる可能性がある。本研究の実施期間中にはこれらの試薬を用いた抽出方法の検討はできなかったが、今後、シストの抽出に対するこれらの試薬の評価を試みることは有効かもしれない。また、近年、定量 PCR の反応試薬も環境 DNA 解析のような抽出物中に PCR 阻害物質を多く含む試料に影響されにくい製品 (例えば TaqMan Environmental Master Mix 2.0 : ThermoFisher Science) がでてきており、反応試薬を変更することにより解決できる可能性もある。底泥が混在している試料でも、より安定した定量ができる手法の改良が望まれる。

(2) シストの生理状態のマーカーとなる発現遺伝子の探索

麻痺性貝毒原因プランクトン *G. catenatum* のシストの休眠から発芽の過程に関与する遺伝子群を明らかにするための基礎データとして、本種シストの mRNA 網羅的解析で得られた 116,244 コンティグ配列 (最小 244 bp, 最大 17,904 bp, 平均 821 bp) を基に Trinity 解析を行い、79,840 のトランスクリプト配列を得た。このトランスクリプト配列について Blastx を用いた相同性解析を実施し、各トランスクリプト配列の機能を推定した結果、配列の 65.8% に当たる 52,534 配列にアノテーションが付いた。また、そのうちの約 12,500 配列は渦鞭毛藻 *Symbiodinium* 属等の遺伝子と相同性が高いものの、機能が不明な遺伝子あるいは既報の情報がないタンパク質と推定される遺伝子であった。

シストの休眠や発芽には光、酸素、温度が関与していることが知られている。発現遺伝子には青色光受容体遺伝子、低酸素環境下で標的遺伝子の転写活性制御因子となる HIF-1A 遺伝子、温度ストレス応答に関与する Cold shock protein (Csp) や Heat shock protein (Hsp) などが確認された。また、酸素ストレスに関連する遺伝子として、低酸素誘導因子である Hypoxia Inducing Factor (HIF) およびその活性を阻害する HIF-1 inhibitor の配列が得られ、トランスクリプト配列数では後者の方が多く確認された。陸上植物でみられる環境ストレス耐性の発現上流で機能することが知られている SNF1-related protein kinase や陸上植物の乾燥耐性、種子の休眠の維持に関与するといわれるアブシシン酸の制御に関与している Protein phosphatase 2C (PP2C) と相同の配列も得られた。本研究では複数のシストの生理状態を把握するためのマーカー候補遺伝子の配列情報を得ることができた。本成果は休眠や発芽を加味したシストの定量手法の開発を進める上での基盤的な情報となると考える。

< 引用文献 >

- Kamikawa R, Nagai S, Hosoi-Tanabe S, Itakura S, Yamaguchi M, Uchida Y, Baba T, Sako Y. Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarensis* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. Harmful Algae 6, 2007, 413-420
- 出村幹英, 小林広茂, 横山智子, 山田佳昭, 河地正伸. リアルタイム PCR を用いた東京湾海底堆積物中からの *Chattonella marina* (ラフィド藻綱) DNA の検出, 藻類 63, 2015, 190-195
- Hosoi-Tanabe S, Tomishima S, Nagai S, Sako Y. Identification of a gene induced in conjugation-promoted cells of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* and *Alexandrium catenella* using differential display analysis. FEMS Microbiology Letters 251, 2005, 161-168
- Park T, Park Y. Detection of *Cochlodinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum* (Dinophyceae) in sediment samples from Korea using real-time PCR. Harmful Algae 9, 2010, 59-65
- Nagai S, Yamamoto K, Hata N, Itakura S. Study of DNA extraction methods for use in loop-mediated isothermal amplification detection of single resting cysts in the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* and *A. catenella*. Marine Genomics 7, 2012, 51-56
- Gaonkar CC, Nishimura T, Funaki H, Hagino K, Yamatogi T, Okunishi S, Maeda H, Nagasaki K, Adachi M. Evaluation of DNA extraction kits for assessing harmful algal community from fish farm sediments. The 18th International Conference on Harmful

Algae Abstract Book, 2018, 80

Jung SW, Kang D, Kim H-J, Shin HH, Park JS, Park SY, Lee T-K. Mapping distribution of cysts of recent dinoflagellate and *Cochlodinium polykrikoides* using next-generation sequencing and morphological approaches in South Sea, Korea. Scientific Reports 8, 2018, 7011

Yarimizu K, Sildever S, Hamamoto Y, Tazawa S, Oikawa H, Yamaguchi H, Basti L, Mardones JI, Paredes-Mella J, Nagai S. Development of an absolute quantification method for ribosomal RNA gene copy numbers per eukaryotic single cell by digital PCR. Harmful Algae 103, 2021, 102008.

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 2件）

1. 著者名 Goh Onitsuka, Mineo Yamaguchi, Setsuko Sakamoto, Tomoyuki Shikata, Natsuko Nakayama, Saho Kitatsuji, Shigeru Itakura, Kiyonari Sakurada, Hidenori Ando, Naoaki Yoshimura, Hirohiko Mukai, Hirokazu Yamashita	4. 巻 96
2. 論文標題 Interannual variations in abundance and distribution of <i>Chattonella</i> cysts, and the relationship to population dynamics of vegetative cells in the Yatsushiro Sea, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Harmful Algae	6. 最初と最後の頁 101833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hal.2020.101833	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 Lum WM, Benico G, Doan-Nhu H, Furio E, Leaw CP, Leong SCY, Lim PT, Lim WA, Lirdwitayaprasit T, Lu S, Muawanah, Nguyen NV, Orlova TY, Rachman A, Sakamoto S, Takahashi K, Teng ST, Thoha H, Wang P, Yniguez AT, Wakita K, Iwataki M	4. 巻 107
2. 論文標題 The harmful raphidophyte <i>Chattonella</i> (<i>Raphidophyceae</i>) in Western Pacific: Its red tides and associated fisheries damage over the past 50 years (1969?2019)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Harmful Algae	6. 最初と最後の頁 102070 ~ 102070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hal.2021.102070	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鬼塚 剛, 山口峰生, 坂本節子, 紫加田知幸, 中山奈津子, 北辻さほ, 板倉 茂, 櫻田清成安東秀徳, 吉村直晃
2. 発表標題 八代海における <i>Chattonella</i> 属シストの分布密度および栄養細胞初期個体群密度と赤潮発生との関係
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本節子
2. 発表標題 貝毒プランクトンの生物学-二枚貝類生産者のための基礎知識
3. 学会等名 令和元年度二枚貝類飼育技術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村裕, 坂本節子, 藤田海音, 増田義男, 田邊徹
2. 発表標題 表層泥を用いたAlexandrium属の種同定に関するプレ・スクリーニング法の開発
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村 裕, 坂本 節子, 増田義男, 田邊徹, 加賀新之助, 渡邊志保
2. 発表標題 東北沿岸で採取した表層泥の遺伝子解析から見たAlexandrium属の水平分布
3. 学会等名 令和2年度 漁場環境保全関係開発推進会議赤潮・貝毒部会 東日本分科会
4. 発表年 2020年

〔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	紫加田 知幸 (Shikata Tomoyuki)		
研究協力者	西出 浩世 (Nishide Hiroyo)		
研究協力者	中山 奈津子 (Nakayama Natsuko)		

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
---------	---------