

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：2018～2021

課題番号：18K05809

研究課題名(和文)ヘテロカプサ赤潮はなぜ貝類のみをへい死させるか 不安定毒素の全容解明への挑戦 -

研究課題名(英文)Why does the red tide of *Heterocapsa* kill only shellfish?

研究代表者

山崎 康裕 (Yamasaki, Yasuhiro)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：40598471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* (以降、本種)は、貝類に極めて強い毒性を示す有害赤潮原因種である。本研究では、毒性の異なる株間、あるいは異なる培養条件間で本種の遺伝子発現量を比較解析した。簡易毒性試験によって選抜された強毒1株と弱毒1株についてエンリッチメント解析を実施した結果、強毒株では弱毒株と比較して光合成関連の遺伝子が特徴的に高発現していた。一方、本種強毒株を窒素あるいはリン欠乏培地で培養したところ、培養5日目以降に光合成活性やシオミズツボワムシに対する毒性の明確な低下が認められたことから、本種の強い毒性発現には光合成の活性化が必要であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本種の溶血活性やシオミズツボワムシ(以下、ワムシ)に対する毒性がアサリに対する毒性と一致したことから、簡易毒性試験は現場に出現した本種の毒性リスク評価に有効であると考えられる。特に、ワムシの曝露試験は低密度(10 cells/mL)でも本種の毒性を検出できることから、赤潮による漁業被害の軽減技術のひとつとして本種法の社会実装が期待される。また、本研究では本種の毒性と光合成活性に相関関係を見出したことから、光合成活性についても現場に出現した本種の毒性リスク評価に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： *Heterocapsa circularisquama* is a harmful red tide-causing dinoflagellate that is extremely toxic to shellfish. In this study, we compared and analyzed the gene expression level of this species between strains with different toxicity or between different culture conditions. As a result of enrichment analysis of a highly virulent strain and an attenuated strain selected by the hemolysis test and the toxicity test using the rotifer *Brachionus plicatilis*, the photosynthesis-related genes were characteristically highly expressed in the highly virulent strain as compared with the attenuated strain. On the other hand, when the highly toxic strain of this species was cultured in a nitrogen or phosphorus-deficient medium, a clear decrease in photosynthetic activity and toxicity to *B. plicatilis* was observed after the 5th day of culture. Therefore, our results suggest that activation of photosynthesis is necessary for the development of toxicity.

研究分野：水圏生産科学

キーワード：赤潮 ヘテロカプサ 溶血活性 トランスクリプトーム 二枚貝へい死 シオミズツボワムシ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の世界的な水産物需要の増大に伴い、水産養殖に大きな期待が寄せられている。特に、貝類は天然の植物プランクトンを餌料とするため給餌の必要性が少なく、養殖生産量が大きく増加している¹⁾。しかし、赤潮が貝類養殖の大きな脅威となっている。なかでも、*Heterocapsa circularisquama* (以下、ヘテロカプサ) は、アコヤガイ、マガキやアサリなどの水産有用二枚貝に対して強い毒性を有し、1990年代半ばからわずか10年ほどで被害総額は70~100億円と推定されている²⁾。これまでに、ヘテロカプサ赤潮の発生機構については随分理解が進んだ一方、へい死機構は未解明のままであり、解毒剤や赤潮耐性品種の育種・作出などの高い効果を持つ被害軽減技術の開発には至っていない。ヘテロカプサは貝類に極めて強い致死効果を持つが、魚類に対して全く毒性が無く、毒素の種特異性や作用機序は大きな謎である。一方、先行研究²⁾により、ヘテロカプサ細胞表面をタンパク質変性剤(SDS)や分解酵素(トリプシン)処理すると二枚貝に対する毒性が低下すること、および膜タンパク質抽出試薬により抽出可能であることから、毒素は細胞表面に局在する膜タンパク質であると推定されている。しかし、膜構造の変化により速やかに失活するだけでなく、専用試薬で抽出しても6時間程度で失活するため、クロマトグラフィーによる毒素の精製が不可能である。以上のような背景から、貝類への漁業被害を軽減して水産増養殖の振興を図るためには、ヘテロカプサが持つ毒素の作用機序や化学構造の解明が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、ヘテロカプサの強毒および弱毒株、簡易毒性試験系、独自の比較ゲノム解析プログラムなどを駆使して、毒性の異なるヘテロカプサの株間、あるいは異なる培養条件における各種遺伝子発現量の比較解析を行い、毒性に関与する遺伝子群の特定、毒素の作用機序および化学構造の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 簡易毒性試験によるヘテロカプサの毒性スクリーニング

ヘテロカプサの毒性評価を行うために、動物赤血球を用いた溶血活性とシオミズツボワムシ(以下、ワムシ)に対する毒性を指標とした簡易毒性試験を行った。まず、ウサギ赤血球を用いた溶血活性試験により、3株のヘテロカプサ(ax9-9, ax10-8およびKamo ax04株)の毒性を比較した。次に、最も強い溶血活性を有していたKamo ax04株について、4種(ウサギ、ウマ、ウシおよびヒツジ)の動物赤血球に対する溶血活性を調べることににより、毒素の反応特異性を検証した。

一方、溶血活性試験により選別されたヘテロカプサ強毒株(Kamo ax04, ax10-8株)および弱毒株(ax9-9株)は、様々な細胞密度(10^1 , 10^2 , 10^3 および 10^4 cells mL⁻¹)や増殖段階(培養開始後1, 5, 9および13日目)にてワムシに曝露した。また、毒素の化学的性状を検証するために、各動物赤血球の共存下におけるヘテロカプサ細胞の曝露およびトリプシン(プロテアーゼ)処理したヘテロカプサ細胞の曝露がワムシの生残に与える影響を調べた。

(2) アサリに対するヘテロカプサの曝露試験

アサリ稚貝(平均殻長 9.2 ± 0.8 mm)と成貝(殻長 23.9 ± 0.8 mm)に対するヘテロカプサ(ax9-9, ax10-8およびKamo ax04株)の曝露試験は、それぞれ500 mL容および1000 mL容ビーカーを用いて3反復で実施した。アサリ稚貝は5個体ずつ、アサリ成貝は3個体ずつビーカーに収容し、25℃に設定した低温恒温器内で、止水、連続暗期および微通気条件にて12時間以上馴致した。曝露試験開始日に各株の計数を行い、ヘテロカプサの曝露密度が $5 \sim 8 \times 10^4$ cells/mLとなるよう塩分30に調整した濾過滅菌海水を用いて希釈調製した後、各株の細胞浮遊液をアサリに曝露した。また、濾過滅菌海水のみにアサリを収容した対照区を設けた。曝露試験は上述の条件にて実施し、経時的にアサリの生残確認を行った。なお、アサリの斃死は、殻が開いて動かない、あるいは殻の隙間を刺激した際に閉殻しない状態とした。

(3) 栄養塩濃度がヘテロカプサの毒性や光合成活性に与える影響

実環境中では、同程度のヘテロカプサ細胞密度であっても、環境条件により貝類のへい死率が大きく変動することが示唆されている³⁾。既往知見によると、ヘテロカプサの毒性は窒素欠乏条件下において低下することが室内実験にて確認されている²⁾。そこで本研究では、栄養塩(窒素もしくはリン)欠乏条件下で培養したヘテロカプサの毒性変化をワムシに対する曝露試験によって判定するとともに、ヘテロカプサの経日的光合成活性の推移を測定した。

(4) ヘテロカプサのトランスクリプトーム解析

強毒株と弱毒株間、および栄養塩欠乏培養等の毒性が増減する条件間で全発現遺伝子を定量比較するために、トランスクリプトーム解析を実施した。実験の手順は、「細胞回収 total RNA 抽出・精製 cDNA ライブラリー作製 次世代シーケンサー(Illumina high-seq)によるシーケ

ンス バイオインフォマティクス解析（アセンブル，アノテーションなど）」である。得られたデータから発現が有意に変動する遺伝子（群）を見出し，生理学的な情報が豊富なモデル生物のオーソログを含めてエンリッチメント解析等を行い，毒性が増減する条件間（強毒株と弱毒株間および栄養塩欠乏培養等）で異なる生物学的プロセスや毒素候補遺伝子の抽出を試みるとともに，それらの機能や毒性への関与を推定した。

(5) 免疫学的手法によるヘテロカプサ毒素の蛍光イメージング

トランスクリプトームおよび比較ゲノム解析により得られた毒素候補の一次構造を基に，エピトープ（抗体が認識する抗原の一部）デザインおよび抗原ペプチドの人工合成を行い，合成ペプチドをウサギへ免疫してポリクローナル抗体を作製した。また，蛍光標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法により，ヘテロカプサ細胞における毒素の局在部位を検証した。

4. 研究成果

(1) 簡易毒性試験によるヘテロカプサ 3 株の毒性評価

溶血活性試験の結果，2 株のヘテロカプサは細胞密度依存的溶血活性を示し，高密度（ $16 \sim 20 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ ）での Kamo ax04 株（強毒株）と ax10-8 株（強毒株）の溶血度は，それぞれ 84% および 15% であった。一方，ax9-9 株（弱毒株）では溶血活性が検出されなかった。また，最も強い溶血活性を有していた Kamo ax04 株（強毒株）は，ウマ（95%），ウサギ（54%），ヒツジ（20%）およびウシ（15%）に対する動物種特異的な溶血活性を示した（図 1a）。

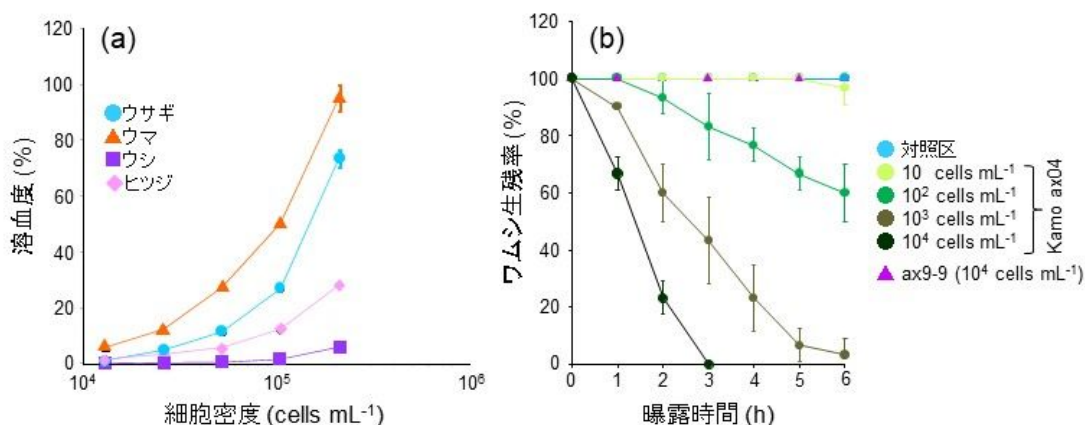


図1. ヘテロカプサ強毒株（Kamo ax04）の動物種特異的な溶血活性（a）とヘテロカプサ強毒株（Kamo ax04）と弱毒株（ax9-9）がワムシの生残に与える影響（b）。

溶血活性と同様に，Kamo ax04 株と ax10-8 株はワムシに対して細胞密度依存的な強い毒性を示し（図 1b），低密度（ $10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ ）でも強い毒性が検出された。一方，ax9-9 株はワムシに対する毒性が検出されなかった。また，異なる増殖段階のヘテロカプサ（ax10-8 株）を用いてワムシに対する曝露試験を行った結果，培養 1 日目を除く全ての強毒株曝露区においてワムシ生残率の有意な低下が認められた（図 2， $P < 0.05$ ）。さらに，アッセイ系への各動物赤血球の添加やヘテロカプサ細胞のトリプシン処理による毒性阻害効果について検討した結果，ワムシの生残率は対照区（トリプシン未処理のヘテロカプサ曝露区）と比較して高くなる傾向にあった⁴⁾。

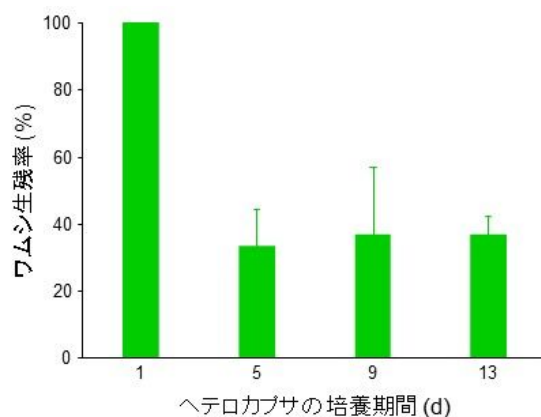


図2. 培養期間の異なるヘテロカプサ強毒株（ax10-8）がワムシの生残に与える影響。

以上の結果より，ヘテロカプサの産生する毒素は，細胞膜の溶解作用を有するタンパク質であることが示唆された。

(2) アサリに対するヘテロカプサの毒性評価

アサリ成貝を用いた曝露試験の結果（図 3），ax10-8 株（強毒株）および ax9-9 株（弱毒株）を ax10-8 株（強毒株）曝露区では試験開始直後からアサリの完全閉殻が確認され，72 時間後の生残率は有意に低下した（図 3， $P < 0.05$ ）。なお，溶血活性やワムシに対する毒性が検出されなかった ax9-9 株（弱毒株）には，アサリに対する致死効果も認められなかった。また，アサリ

稚貝を用いた曝露実験の結果⁵⁾, Kamo ax04 株 (強毒株) を曝露されたアサリの 48 時間後と 72 時間後における生残率は, それぞれ 33.3% および 0% であった。一方, ax9-9 株 (弱毒株) を曝露されたアサリの 48 時間後と 72 時間後における生残率は, それぞれ 100% および 86.7% であった。なお, ax9-9 株 (弱毒株) 曝露区では, アサリがヘテロカプサ細胞を擬糞として排泄することにより, 飼育水中のヘテロカプサ細胞密度を経時的に減少させた。

以上の結果より, ヘテロカプサの溶血活性やワムシに対する毒性がアサリに対する毒性と一致したことから, 簡易毒性試験によるヘテロカプサの毒性評価の有効性が示された。

(3) 栄養塩濃度がヘテロカプサの毒性や光合成活性に与える影響

ax10-8 株 (強毒株) を窒素欠乏およびリン欠乏培養した区では, 培養開始から 3 日目以降に増殖が停滞した (図 4a)。その後, 両栄養塩欠乏区では, 培養開始から 5 日目以降より光合成パラメータ (Fv/Fm: 光化学系 のクロロフィル a における光化学反応の最大量子収率, qP: クロロフィル蛍光の光化学的消光, NPQ: クロロフィル蛍光の非光化学的消光および ϕ_{II} : 一定の励起光下での実効量子収率) が完全培地区と比較して低下した (図 5)。培養開始から 7 日目のヘテロカプサ細胞を用いて, ワムシに対する曝露試験 (曝露密度: 10^3 cells mL⁻¹) を行った。結果として, 6 時間および 24 時間経過後の完全培地区におけるワムシの生残率が, それぞれ 60% および 9% まで低下した (図 4b)。これに対して, 6 時間および 24 時間経過後の窒素欠乏区におけるワムシの生残率は, それぞれ 88% および 46% であり, リン欠乏培養区におけるワムシの生残率は, それぞれ 88% および 52% であった (図 4b)。

以上の結果より, ヘテロカプサのワムシに対する毒性は光合成活性の低下や栄養塩欠乏により低下することが明らかとなり, 毒の産生や毒性発現に光合成が関与している可能性がある。

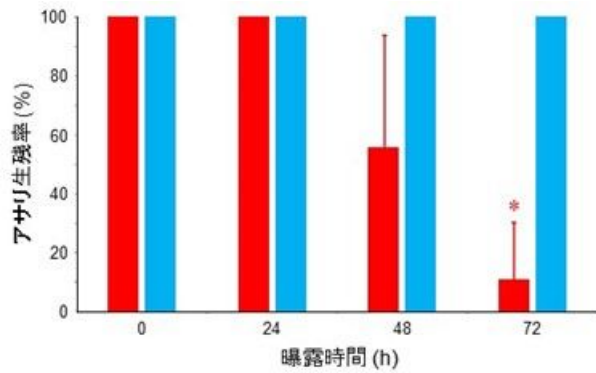


図3. ヘテロカプサ強毒株 (ax10-8: ■) と弱毒株 (ax9-9: ■) がアサリ成員の生残に与える影響。

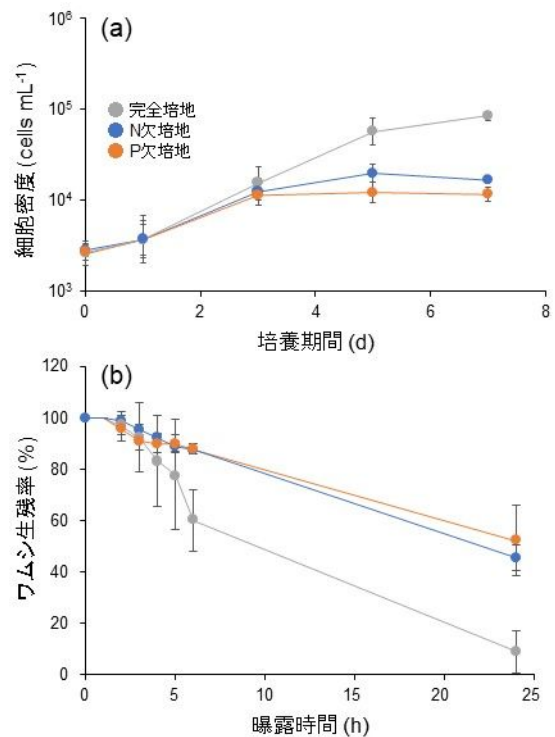


図4. 異なる栄養条件で培養したヘテロカプサ強毒株 (ax10-8) の増殖 (a) とワムシに対する毒性 (b)。

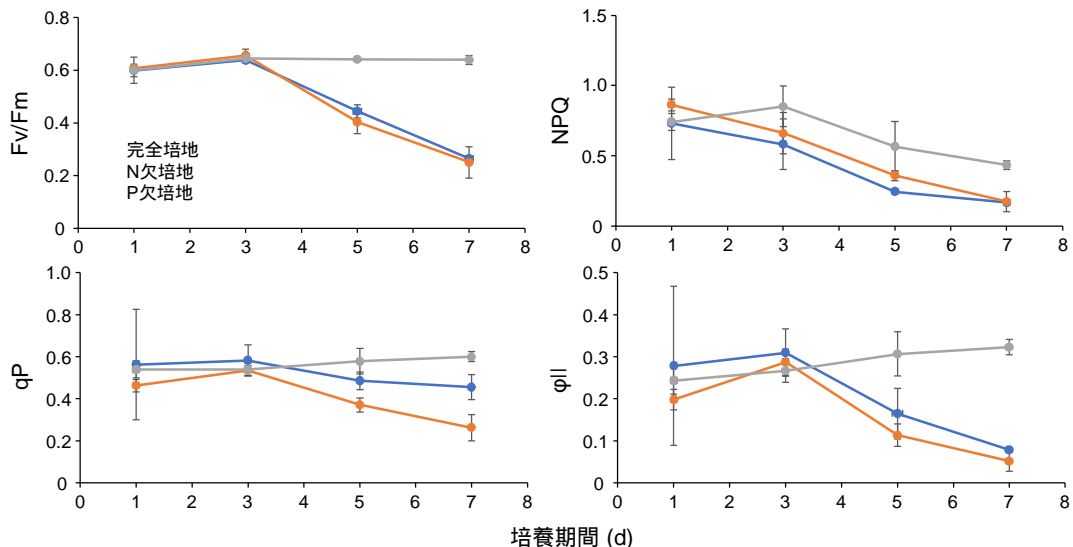


図5. 異なる栄養条件で培養したヘテロカプサ強毒株 (ax10-8) における光合成パラメータの経日変化。

(4) トランスクリプトーム解析によるヘテロカプサの毒性発現機構の推定

ヘテロカプサが産生する毒素候補の選抜を行うために、ax10-8 株（強毒株）と ax9-9 株（弱毒株）のトランスクリプトーム解析を実施した。この結果、膜貫通領域を有し、かつ、強毒株で有意に（FDR < 0.01）高く発現している 214 個の膜タンパク質関連の遺伝子群を見出すことに成功し、これらのうち強毒株には溶血活性に関連する複数の遺伝子群が確認された。また、ヘテロカプサの強毒株（Kamo ax04 株、ax10-8 株）と弱毒株（ax9-9 株）に加え、更なる毒性試験により弱毒株と判定された 10-5 株および HAG 株を加えた全 5 株についてクラスタリングや多次元尺度構成法により解析を行った。結果として、両解析ではクラスターが本種の毒性や分離海域では分類されなかった。そこで、傾向が類似する ax10-8 株（強毒株）と ax9-9 株（弱毒株）についてエンリッチメント解析を実施した結果、強毒株と比べて弱毒において上方発現した遺伝子のうち、G0 アノテーションが付いた遺伝子は 47,777 個あったのに対し、下方発現した遺伝子については全て G0 アノテーションが付かなかった。強毒よりも弱毒で有意に発現量の高かった遺伝子は主に光合成に関連するものであった。

今後は、これまで解析してきた強毒 2 株と弱毒 3 株に栄養塩欠乏（光合成活性の低下）条件下で培養した強毒株を含めた全データを用いて、統合的な解析を進め、ヘテロカプサの毒素候補タンパク質の推定や免疫学的手法による毒性発現機構の検証を進める予定である。

(5) 免疫学的手法によるヘテロカプサ毒素の蛍光イメージング

免疫学的手法によるヘテロカプサ毒素の特定を円滑に遂行するために、ヘテロカプサ強毒株（ax10-8 株）での発現が確認された膜タンパク質である NADPH オキシダーゼに対する抗体を作製して間接蛍光抗体法の条件検討を行った。この結果、作製した抗体は本種細胞表面に存在すると考えられる NADPH オキシダーゼを認識したことから、トランスクリプトーム解析で得られた配列情報を用いた抗体作製および免疫学的研究の円滑な推進に必要な条件等を確立することができた。なお、さらなるトランスクリプトーム解析によって毒素候補タンパク質の一次構造が得られた場合は、候補タンパク質の一次構造からエピトープを人工合成・免疫してポリクローナル抗体を作製し、ヘテロカプサ細胞における毒素の局在部位や毒素の作用メカニズムについて検討を進める予定である。

< 引用文献 >

1) 平成 28 年度水産白書，水産庁，2016，

<https://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/H28/index.html>

2) 松山幸彦：有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する 生理生態学的研究 - *H. circularisquama* の毒性および貝類斃死機構の解明。水産総合研究センター研究報告，9，2003，13-117

3) Matsuyama Y, Uchida T, Nagai K, Ishimura M, Nishimura A, Yamaguchi M, Honjo T: Biological and environmental aspects of noxious dinoflagellate red tides by *Heterocapsa circularisquama* in the west Japan. In Harmful and Toxic Algal Blooms (eds. Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y), IOC of UNESCO Paris, 1996, 247-250

4) 山崎康裕，紫加田知幸：簡易毒性試験を用いた渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* が産生する毒素の性状解析。令和 3 年度日本水産学会中国・四国支部例会（2021）

5) 山崎康裕，和田佳大，紫加田知幸：簡易毒性試験による渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 株間における毒性の比較。令和 2 年度日本水産学会中国・四国支部例会（2021）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 康裕, 和田 佳大, 紫加田 知幸
2. 発表標題 簡易毒性試験による渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> 株間における毒性の比較.
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会中国・四国支部例会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎康裕, 亀尾辰砂, 紫加田知幸, 中山奈津子, 西出浩世, 内山郁夫
2. 発表標題 有害渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> の株間における毒性と発現遺伝子の比較.
3. 学会等名 2019年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀尾辰砂, 山崎康裕, 山内香澄, 中山奈津子, 紫加田知幸
2. 発表標題 簡易毒性試験による渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> の毒性評価
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	紫加田 知幸 (Shikata Tomoyuki) (40603048)	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)・主任研究員 (82708)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	内山 郁夫 (Uchiyama Ikuo) (90243089)	基礎生物学研究所・ゲノム情報研究室・准教授 (63904)	

	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
連携研究者	中山 奈津子 (Nakayama Natsuko) (20612675)	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)・主任研究員 (82708)	

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