

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380116

研究課題名（和文）下痢性貝毒原因種 *Dinophysis* 属の増殖生理と毒生産能に関する研究研究課題名（英文）Study on growth, physiology and toxicology of *Dinophysis* spp. causing diarrhetic shellfish poisoning

研究代表者

神山 孝史 (KAMIYAMA TAKASHI)

独立行政法人水産総合研究センター・東北区水産研究所・主幹研究員

研究者番号：60371803

研究成果の概要（和文）：*Dinophysis* 属の栄養生理特性、増殖・毒生産能とそれらに及ぼす環境条件の影響を調べた。国内各地における自然群集の *Dinophysis* 属各種の細胞毒量の特徴を明らかにした。本属の増殖は、クリプト藻 *Teleaulax amphioxeia* を餌とする繊毛虫 *Myrionecta rubra* の存在に強く依存し、温度、光の影響を強く受け、一部の毒成分は増殖の進行と共に細胞外に活発に排出された。同じ環境下で培養された同一種の毒量や毒組成が株間で大きく違う場合があり、遺伝的要因の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined characteristics of growth, nutritional physiology and lipophilic toxin production of the genus *Dinophysis* and effects of environmental conditions on them. Characteristics of cellular toxin contents and toxin composition of natural *Dinophysis* spp. collected in various Japanese coastal waters were clarified. In laboratory experiments growth of *Dinophysis* spp. depends on specific prey source, the ciliate *Myrionecta rubra*, feeding on the Cryptophyceae *Teleaulax amphioxeia*, and was influenced by temperature and light intensity. Toxin production also varied in response to these environmental factors and growth phase. Parts of toxin components were excreted into surrounding seawater with progress of the growth. Cellular toxin contents were occasionally largely different among local strains of *Dinophysis* species cultivated under the same conditions, suggesting effects of genetic characteristics on the toxin production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：微小動物プランクトン

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：有毒プランクトン、下痢性貝毒、ディノフィシス、*Dinophysis acuminata*、*Dinophysis fortii*、毒生産、オカダ酸、ペクテノトキシン

1. 研究開始当初の背景

下痢性貝毒は、麻痺性貝毒とともに食品の

安全を脅かす問題の一つであり、その発生はその海域の二枚貝等の出荷規制を引き起こ

すことで、水産業収益に大きな被害を及ぼす。こうした被害の軽減のために二枚貝の毒化予察技術開発は極めて重要であるが、それには解明すべき多くの課題が残されている。

下痢性貝毒の発生原因は有毒渦鞭毛藻プランクトン *Dinophysis* 属を二枚貝が摂食することにより、*Dinophysis* 属の出現状況が下痢性貝毒の発生に大きな影響を及ぼす。しかし、*Dinophysis* 属の発生と二枚貝の毒化の齟齬が見られることが多く、貝毒の予察技術開発上の大きな問題となっている。その一因は、*Dinophysis* 属の毒組成や毒生産能が著しく変化することにより、本属の増殖過程での毒組成や毒生産能の特徴を解明することは学術的かつ産業的に極めて重要な課題といえる。

Dinophysis 属は直接あるいは間接的にクリプト藻葉緑体を細胞内に取り込み、この葉緑体を利用してエネルギーを得ている (Kleptoplastidy) という説が提唱され、Park et al. (2006)が、クリプト藻 *Teleaulax* sp.を餌として培養した繊毛虫 *Myrionecta rubra* をさらに *D. acuminata* に餌として与えることにより、これまで困難であった *Dinophysis* 属 (*D. acuminata*) の高密度・長期継代培養に成功した。我々も同様な手法で、葉緑体を保持する *Dinophysis* 属数種の高密度での長期継代培養に国内で最初に成功している。また、*Dinophysis* 属の毒生産動態を詳細に解析するためには、毒の超高感度精密分析の技術が不可欠である。申請者のグループは、下痢性貝毒を含む脂溶性貝毒の既知の毒成分とともに未知の毒の類縁体を高精度で検出する技術を開発し、毒や毒代謝物の超高感度精密分析技術では先導的な研究成果をあげてきた。

2. 研究の目的

本研究では、最近明らかになった *Dinophysis* 属の培養手法を発展させ他の種にも応用す

ることで、*Dinophysis* 属の増殖にかかわる生理特性、特に栄養特性の詳細を明らかにする。一方、高精度の分析技術を用いることで異なる海域から分離培養された *Dinophysis* 属の種類、分布海域および培養条件等の違いによる毒生産能や毒成分の特徴を詳細に調べ、*Dinophysis* 属の毒生産や毒組成についての知見を得る。以上の成果より、*Dinophysis* 属の増殖のカギとなる栄養的な要因を明らかにするとともに、毒生産や組成に及ぼす地域的、環境的な要因を解明し、緻密で高精度な下痢性貝毒の監視体制の確立に資する。

3. 研究の方法

1) *Dinophysis* 属の栄養特性の把握

①クリプト藻起源葉緑体の機能の解明

Myrionecta rubra の捕食によって取り込んだ主な *Dinophysis* 属の葉緑体の光合成活性を、 ^{13}C 法によって明らかにするため、飽食させた *Dinophysis* 細胞を餌無しの条件で培養し、その後一定量の炭素安定同位体 (^{13}C) をトレーサーとして添加し、6時間程度の培養後に取り込まれた ^{13}C 量を分析することにより、炭素同化速度を測定した。

クリプト藻 *Teleaulax amphioxeia* → *M. rubra* → *Dinophysis* 属の食物連鎖がどの程度、厳密性を有するのかを調べるため、初めに *M. rubra* に対して複数の属に分類されるクリプト藻を餌として培養することを試みた。

②未知餌料生物の有効性の検討

Dinophysis 属各種が出現する時期を中心に現場海水を採取し、*T. amphioxeia* を餌料とする多様な繊毛虫類を分離し、培養した。別途、現場海水から分離あるいはあらかじめ維持培養した *Dinophysis* 属各種に培養した繊毛虫類を与え、その増殖効果の有無を調べた。

2) *Dinophysis* 属の毒生産能の特徴とそれに及ぼす環境条件の影響の解明

① *Dinophysis* 属の毒生産能の特徴

異なる *Dinophysis* 属主要種を培養した後、その懸濁液をろ過海水中で破碎し、微量の溶媒でさらに濃縮後、高速液体クロマトグラフィードンデム型質量分析法(LC-MS/MS)で、抽出された毒量と毒成分組成を詳細に調べることによって、*Dinophysis* 属の脂溶性毒（ジイノフィシストキシン[DTX] 1、オカダ酸、PTX 2）の細胞毒量と組成の種類間の違いを調べた。また、大量培養によって得られた *Dinophysis* 属の藻体から新規毒を精製して、それらの化学構造を調べた。

異なる海域から分離培養された *Dinophysis* 属主要種を同一環境条件で培養し、得られた *Dinophysis* 属の毒成分を上記の手順で調べることによって、*Dinophysis* 属主要種の毒生産能が地域個体群によってどの程度異なるかを検討した。

我が国の沿岸域から自然群集の *Dinophysis* 属各種を最高 100 細胞ずつ採集し、主要毒成分の毒量を上記の手順で分析した。また、一部では同じ個体群から培養株を作成し、その主要毒を分析し、天然細胞と培養細胞の毒量や毒組成の違いの特徴を調べた。

② *Dinophysis* 属の増殖と毒生産能に及ぼす環境条件の影響

Dinophysis 属主要種を異なる温度や光条件で培養し、その細胞密度の変化を追跡した。また、定期的に培養液の一部を採集し、上記の方法でその藻体と環境中の脂溶性毒を濃縮し、分析した。これらの結果から、増殖や毒生産に及ぼす温度、光等条件の影響を検討した。なお、一部の実験では培養期間中に餌料を追加することによって起こる細胞密度の変化や細胞毒量の変化を追跡し、毒生産に及ぼす餌料の効果を調べた。

4. 研究成果

1) *Dinophysis* 属の栄養特性の把握

① クリプト藻起源葉緑体機能の解明

培養された *Dinophysis* 属はその葉緑体に応じて光合成活性をもつことが確認された。また、*M. rubra* に複数の属に分類されるクリプト藻種を餌として与えても、*T. amphioxeia* 以外では増殖は認められず、*M. rubra* は *T. amphioxeia* に強く依存することが確認された。

② 未知餌料生物の有効性の検討

Teleaulax amphioxeia を餌料として培養した混合栄養少毛類繊毛虫 *Strombidium chlorophilum* および *Tontonia* sp. を *Dinophysis* 属に与える予備実験を繰り返したが、*Dinophysis* 属の増殖は認められず、捕食行動も観察されなかった。その他にも従属栄養繊毛虫 *Strombidinopsis* sp. も餌料とした実験でも同様な結果であった。本研究では *M. rubra* 以外に *Dinophysis* 属の有効な餌料を見出すことができなかった。

2) *Dinophysis* 属の毒生産能の特徴とそれに及ぼす環境条件の影響の解明

① *Dinophysis* 属の毒生産能の特徴

Dinophysis 属プランクトンの毒組成に関する知見は極めて少なかったが、自然個体群の分析で *D. infundibulus* が DTX1 と PTX2 を生産することが世界で初めて明らかにされた。また、国内の *Dinophysis norvegica* や *Dinophysis caudata* から PTX2 と DTX1 を初めて検出したことや、これまで情報が少なかった日本海側における *D. fortii* の細胞毒量の特徴を新たに明らかにするなど、本属の自然個体群の毒組成に関する新たな知見を数多く蓄積した。

北海道・東北海域および西日本各地の *Dinophysis* 属プランクトンを単離し、毒組成を解析した結果、種類によりその組成および細胞毒量に大きな違いがあることや、同一海域の同一種間でも毒組成や毒量に大きな差異があることが明らかになった（図1）。

さらに、同じプランクトン試料から作成し

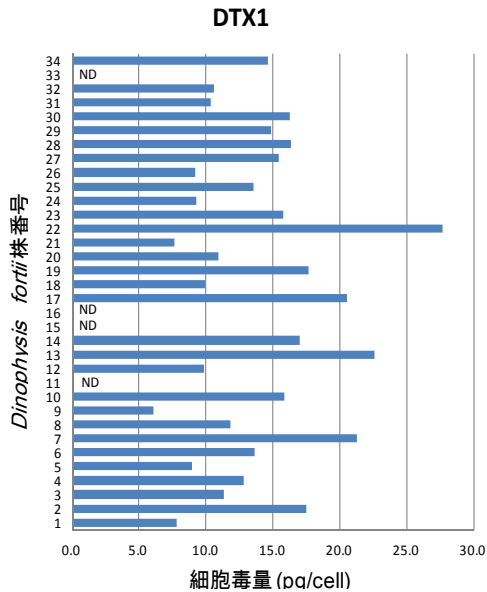


図1 2011年5月に秋田県1海域で分離された *Dinophysis fortii* の34培養株のDTX1細胞毒量. ND: 検出限界未満

た培養株の毒組成が自然個体群の組成と変化するケースも確認した。以上の結果から *Dinophysis* 属の細胞毒量や毒組成は、種類によって異なるとともに環境条件で大きく変化するかと推察された。

北日本の北海道能取湖と西日本の広島湾からクローン株を分離し、同一環境条件で培養した *D. fortii* と *D. acuminata* の細胞あたりの脂溶性毒を比較したところ、能取湖産株が広島湾株よりもそれぞれ80倍程度と20倍程度高い値を示した。この結果から *Dinophysis* 属の細胞毒量には環境要因の他に遺伝的要因も関与する可能性が考えられた。

培養実験において、下痢性貝毒がほとんど発生しない西日本から分離した *D. acuminata* の培養株でも東日本の自然群集と同等の細胞毒量となる場合が認められ、西日本にも高い毒量を産生する *D. acuminata* が分布することが明らかとなった。

本研究の中で新たに *Dinophysis tripos* の培養に成功し、その増殖活性を把握した。また、本種が PTX2 を多量に生産することが培養実験で確認され、自然群集の本種の細胞内

PTX2 含量が他の種より高いことを裏付けた。

これまで二枚貝からのみ検出されていた下痢性毒類縁体であるオカダ酸ジオールエステルを国内で初めて *D. fortii* 及び *D. acuminata* の大量培養液から検出し、精製および構造解析の試料を得た。一方、二枚貝から検出されるオカダ酸群脂肪酸エステルが *Dinophysis* 属からは検出されず、本成分は二枚貝類の代謝産物であることが判明した。

② *Dinophysis* 属の増殖と毒生産能に及ぼす環境条件の影響

Dinophysis fortii と *D. acuminata* の2種に *M. rubra* をそれぞれ餌料とした時の増殖と毒生産に及ぼす培養温度の影響を検討した結果、各温度条件区 (10、14、18、22℃) において *D. fortii* は最大650~4,000細胞/mLまで、*D. acuminata* は1,700~4,200細胞/mLまで増殖し、両種とも今回設定した温度区では、高温ほど良好な増殖を示すことが判明した。また、両種とも主要毒3成分がすべて検出され、いずれも高温ほど生産量が高くなる傾向が認められた。オカダ酸・DTX1の生産量は、両種の間には有意な差がなかったが、PTX2では約2倍程度 *D. fortii* の方が多かった。また、指数増殖期間中の *D. acuminata* の平均細胞毒量を培養温度間で比較したところ、PTX2については低温ほど高くなる傾向が認められた (図2)。さらに、播磨灘から分離した *D.*

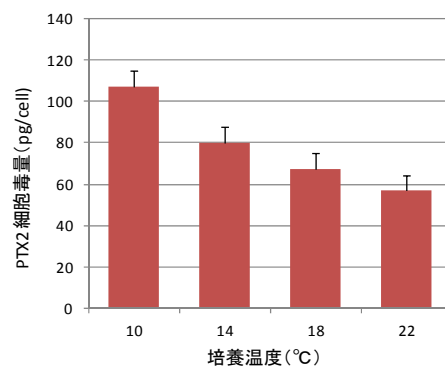


図2 異なる温度条件で培養された *Dinophysis fortii* の指数増殖期間での平均細胞毒量

acuminata 培養株を用いて、さらに細かな温度設定での培養実験を実施した結果、増殖速度および最大細胞密度は、20~26°Cで見られ、毒生産は 20~23°Cで最大値を示すことが明らかになり、毒生産に好適な温度のあることが確認された。以上のように、*Dinophysis* 属の増殖および毒生産に温度が大きな影響を及ぼすことが判明した。

Dinophysis acuminata と *D. fortii* が増殖過程において生産する毒量の変化を詳細に調べた結果では、餌を活発に捕食することで毒を活発に生産することが確認され、その生産された一部の毒成分については、細胞外に活発に放出され細胞外放出量は、培養終了時に全体の 80%以上に達した (図3)。

光強度が *D. fortii* の密度変化に及ぼす影響

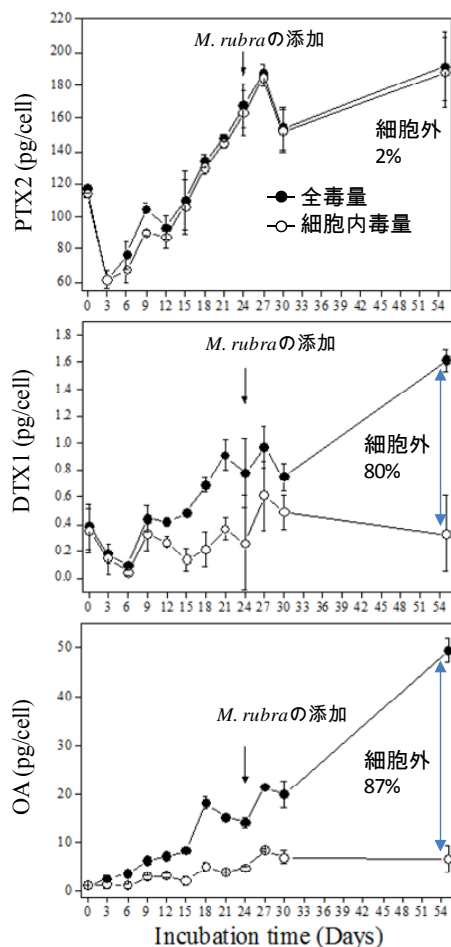


図3 培養実験における *Dinophysis fortii* の培養液全毒量と細胞内毒量の推移

を室内半連続培養実験で検討した結果、餌料が豊富な条件でも光強度の低い時には高い密度を維持できないことが判明した。また、正の増殖速度には約 5 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 以上の光が必要となることがわかり、光条件が本種の増減に大きな影響を及ぼすことが判明した。

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 15 件)

①Nishitani, G., Nagai, S., Hayakawa, S., Kosaka, Y., Sakurada, K., Kamiyama, T., 他 1 名 (2012) Multiple plastids collected by the dinoflagellate *Dinophysis mitra* through kleptoplastidy Applied and Environmental Microbiology 78: 813-821. 査読有

②畑 直亜, 鈴木 敏之,ほか 2 名 (2011) 伊勢湾における有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属の発生とムラサキイガイ *M. ytilus galloprovincialis* の毒化との関係. 日本水産学会誌 77:1065-1075. 査読有

③Nagai, S., Suzuki, T., Nishikawa, T. and Kamiyama, T. (2011) Differences in the production and excretion kinetics of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 between cultures of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis fortii* isolated from western Japan. Journal of Phycology 47: 1326-1337. 査読有

④Suzuki, T.ほか 1 名 (2011) LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. Analytical Sciences 27 : 571-584. 査読有

⑤Kamiyama, T., Nagai, S., Suzuki, T., ほか 1 名 (2010) Effect of temperature on production of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 by *Dinophysis acuminata* in culture experiments. Aquatic Microbial Ecology 60: 193-202. 査読有

⑥Kim, J. H., Lee, K. J., Suzuki, T. ほか 4 名 (2010) Seasonal variability of lipophilic shellfish toxins in bivalves and waters, and abundance of *Dinophysis* spp. in Jinhae Bay, Korea. Journal of Shellfish Research 29: 1061-1067. 査読有

⑦ Nishitani, G., Nagai, S., Baba, K.,

Kiyokawa, S., Kousaka, Y., Miyamura, K., Nishikawa, T., Sakurada, K., Shinada, A. and Kamiyama, T. (2010) High-level congruence of *Myrionecta rubra* prey and *Dinophysis* species plastid identities as revealed by genetic analyses of isolates from Japanese coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2791-2798. 査読有

⑧ Suzuki, T., Kamiyama, T., ほか 4 名 (2009) Liquid-chromatographic hybrid triple-quadrupole linear-ion-trap MS/MS analysis of fatty acid esters of dinophysistoxin-1 in bivalves and toxic dinoflagellates in Japan *Fisheries Science* 75: 1039-1048. 査読有

⑨ Kamiyama, T. and Suzuki, T. (2009) Production of *Dinophysistoxin-1* and pectenotoxin-2 by a cultured of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 8: 312-317. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

①鈴木 敏之、国内沿岸で採集した *Dinophysis* 属の LC-MS/MS による毒組成分析、平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年 9 月 29 日、長崎大学

②神山 孝史、有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis tripos* の増殖特性と毒生産、平成 22 年度日本水産学会秋季大会 2010 年 9 月 24 日、京都大学

③鈴木 敏之、Fatty acid esters of diarrhetic shellfish toxin dinophysistoxin-1 in bivalves and toxic dinoflagellates in Japan, 44 th Toxic Microorganisms Joint Panel, UJNR Scientific Session, 2009 年 11 月 10 日、国立医薬品食品衛生研究所

④Nagai, S., Predation on the ciliate *Myrionecta rubra* by the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata/fortii/infundibulus* and observation of sequestration of ciliate chloroplasts, 6th International Workshop on Targeted HAB species in the East Asia Waters. 6th International Workshop on Targeted HAB species in the East Asia Waters, 2009 年 11 月 21 日、**東京大学**

⑤長井 敏、西日本から単離した下痢性貝毒原因渦鞭毛藻 *Dinophysis fortii* の毒生産に及ぼす培養温度の影響、平成 22 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学藤沢キャンパス

⑥長井 敏、西日本から単離した下痢性貝毒原因渦鞭毛藻 *Dinophysis acuminata* および *D. fortii* の毒生産と排出、2009 年 3 月 27 日、日本大学藤沢キャンパス

[図書] (計 1 件)

Suzuki, T. and Watanabe, R., Nova Science Pub Inc, *New Trends in Marine and Freshwaters Toxins: Food Safety Concerns* (Eds: Cabado, A. G. and Vieites, J. M.),

Chapter 10. Shellfish toxin monitoring system in Japan and some Asian countries.2011, pp.305-314

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：下痢性貝毒オカダ酸・ジノフィシストキシン群または脂溶性毒ペクテノトキシン群の製造方法

発明者：鈴木敏之・長井 敏・神山孝史
権利者：独立行政法人水産総合研究センター

種類：特許、特願

番号：2009-275063 (基礎出願 2009-141174)

出願年月日：平成 21 年 12 月 3 日 (基礎出願 平成 21 年 6 月 12 日)

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://feis.fra.affrc.go.jp/cgi-bin/htmlgen/htmllab.cgi?yudoku>

<http://feis.fra.affrc.go.jp/HABD/TPS/top-page.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 孝史 (KAMIYAMA TAKASHI)

独立行政法人水産総合研究センター・東北
区水産研究所・主幹研究員

研究者番号：60 371803

(2) 研究分担者

鈴木 敏之 (SUZUKI TOSHIYUKI)

独立行政法人水産総合研究センター・中央
水産研究所・グループ長

研究者番号：70371804

長井 敏 (NAGAI SATOSHI)

独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸
内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：80371962

西谷 豪 (NISHITANI GO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70450781

(3) 連携研究者

なし