

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580204

研究課題名（和文） 赤潮プランクトン、コクロディニウムとシャットネラの毒性因子の比較

研究課題名（英文） Comparative study on the toxic factors of *Chochlodinium polykrikoides* and *Chattonella marina*

研究代表者

小田 達也 (ODA TATSUYA)

長崎大学・水産学部・教授

研究者番号：60145307

研究成果の概要（和文）：シャットネラでは常に活性酸素が検出されるが、コクロディニウムでは検出されなかった。魚鰓粘液物質やレクチンの刺激によりシャットネラの活性酸素産生は上昇したが、コクロディニウムでは低値のままであった。コクロディニウムの水抽出物は培養細胞に対して毒性を示したが、シャットネラの抽出物には細胞毒性はなかった。シャットネラが、活性酸素産生を介した魚毒性を示すのに対して、コクロディニウムでは、細胞毒性因子や粘液物質を介した毒性を発現すると推察された。

研究成果の概要（英文）：Generation of reactive oxygen species (ROS) by *Chattonella marina* could be confirmed by ESR spin trapping method. Immunohistochemical analysis of gill lamellae from yellowtail exposed to *C. marina* using antiserum against crude glyocalyx demonstrated that there were the antigens recognised by the antiserum on the surface of gill lamellae. As compared to *C. marina*, the levels of ROS detected in *Cochlodinium polykrikoides* were trace levels. Furthermore, no significant increase in O_2^- generation by *C. polykrikoides* was observed in the presence of lectins or fish mucus prepared from skin and gill of yellowtail, whereas *C. marina* generated increased level of O_2^- responding to these stimuli. The cell-free aqueous extract prepared from *C. polykrikoides* showed toxic effect on HeLa cells, but the extract of *C. marina* had almost no effect. Furthermore, gradual accumulation of polysaccharides in the medium was observed during the culture of *C. polykrikoides*, but no such change was observed in the medium of *C. marina*. These results suggest that ROS may play a significant role in the fish-killing activity of *C. marina*, whereas in the case of *C. polykrikoides*, certain toxic substances or polysaccharides are mainly responsible for the toxicity rather than ROS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：プランクトン

1. 研究開始当初の背景

赤潮の原因植物プランクトンで、赤潮発生に伴い甚大な漁業被害をもたらす主な種として、シャットネラ・マリーナ、コクロディニウム・ポリクリコイデス、ヘテロシグマ・アカシワ、カレニア・ミキモトイ、ヘテロカプサ・サーキュラリスクアーマ等が知られている。これまで我々は、数十年來、シャットネラの生物学的側面及び毒性発現機構解明に取り組んでおり、特に本種の最大の特徴として、高濃度の活性酸素を産生放出することを明らかにしており、その産生機構や魚毒性との関連性、及びシャットネラにおける活性酸素産生の生物学的意義について明らかにしてきた。活性酸素の他、シャットネラ細胞からは魚毒性原因物質として高度不飽和脂肪酸、血球凝集素、神経毒素であるブレベトキシン様物質の存在が報告され、これら毒性因子による魚毒性発現説が提示されている。しかしながら、主にブリを用いたこれまでのシャットネラ暴露実験により、活発に遊泳しているシャットネラ生細胞は強い魚毒性を発現するが、シャットネラ細胞を遠心等で除去した培養上清、死細胞あるいは細胞破壊液は全く毒性を示さないことが報告されている。従って、シャットネラの魚毒性発現には生きたシャットネラ細胞と魚類との直接接触が必須であると考えられる。有機溶媒等を用いて抽出される比較的安定な毒性物質が実際の毒性発現機構に関与しているとは考えにくく、活性酸素の様な比較的不安定で、生きた細胞の代謝過程で連続して産生される生物毒性因子の関与が強く示唆される。さらに、最近の我々の研究により、シャットネラは通常の培養条件下で、一酸化窒素を産生している可能性を示す実験結果が得られた。従って、シャットネラの毒性発現には活性酸素の他、一酸化窒素も関与している可能性が考

えられる。スーパーオキシドと一酸化窒素との反応により生成されるペルオキシナイトライトは特に強い毒性が知られており、活性酸素と一酸化窒素の相乗的毒性発現の可能性も考えられる。一方、日本の他、韓国等、諸外国においてコクロディニウム赤潮の頻発及びそれに伴う漁業被害が大きな問題となっており、緊急な対策等の必要性が高まっている。シャットネラがラフィド藻類に属するのに対し、コクロディニウムは渦鞭毛藻類に属し、両者は異なる種であるが、シャットネラと同様、コクロディニウムは強い魚毒性を発現することが知られている。さらに興味深いことに、コクロディニウム赤潮による養殖魚の斃死状況がシャットネラ赤潮の場合と類似しているとの指摘がある。これまでの研究により、コクロディニウムの魚毒性にある種の毒性物質が関与すると報告されている。一方、最近、韓国の研究グループは活性酸素を介した魚毒性の機構を提案し、シャットネラとの類似性を指摘しているが、詳細な毒性機構については世界の多くの研究者間で一致した見解に至っていない。そこで本研究では、これまでのシャットネラ研究の経験に基づき、コクロディニウムの毒性機構、特に活性酸素の関与について、シャットネラとの比較研究を実施した。

2. 研究の目的

コクロディニウムの活性酸素産生の有無について、これまでのシャットネラでの経験に基づき複数の生化学的手法により検討する。その際、常にシャットネラとの比較を行い、生物毒性を発現しうるレベルか否かについて検証する。シャットネラの場合、分離場所が異なる株間で活性酸素産生量が大きく異なることを見出していることから、コクロディニウムについてもできるだけ複数の分離

株について検討する必要がある。さらに、自然界から分離され、人工的環境下で長期に培養されたコクロディニウムは魚毒性が低下しているとの指摘もあることから、赤潮現場から分離されたフレッシュな状態での測定も可能な限り実施する。さらに、活性酸素以外の毒性因子の存在、特に、ある種の毒素の存在の有無、さらに、一酸化窒素の産生についても検討し、コクロディニウムの魚毒性発現機構に関する総合的検討を実施する。

3. 研究の方法

本研究では、これまで行ってきたシャットネラの活性酸素産生に関する解析手法をコクロディニウム研究に応用し、その活性酸素産生の有無及びそのレベルをシャットネラとの比較との観点から詳細に調べた。できるだけ多くのコクロディニウム分離株を各研究機関あるいは水産関連施設から入手し、活性酸素産生について、検出感度に優れた化学発光法を主に利用した。可能な限り、日本国内分離株のみならず、諸外国、特に韓国沿岸域で分離されたコクロディニウム株の活性酸素産生について調べ、分離場所と活性酸素産生レベルとの関係に関するデータベースの構築を目指した。さらに、研究室内での培養が可能となった株については、生育状態、水温、光強度、栄養状態等培養条件と活性酸素産生レベルとの関連性について詳細に調べた。これらコクロディニウムの生化学的諸性質に関する研究については研究期間の前半でほぼ終了し、後半部では活性酸素産生を介した毒性機構も視野に入れつつ、コクロディニウムの魚毒性発現機構の解明に取り組んだ。特に、活性酸素以外の毒性因子として、一酸化窒素産生或は他の生物毒素の存在について種々の生化学的手法により検討した。

4. 研究成果

シャットネラがラフィド藻類に属するのに対し、コクロディニウムは渦鞭毛藻類に属し、両者は異なる種であるが、シャットネラと同様、コクロディニウムは強い魚毒性を発現することが知られている。さらに興味深いことに、コクロディニウム赤潮による養殖魚の斃死状況がシャットネラ赤潮の場合と類似しているとの指摘がある。日本近海で分離された複数のコクロディニウム株について活性酸素産生について検討したが、いずれも検出限界以下であった。なお、活性酸素産生が知られているシャットネラでは同条件下で常に高いレベルの活性酸素が検出された。一方、シャットネラの活性酸素産生は魚鰓由来粘液物質などの刺激によって著しく上昇することが知られている。そこで魚鰓粘液物質やレクチン (Con A, WGA) など刺激作用が知られている物質添加時の活性酸素産生レベルを調べた。シャットネラでは顕著な活性酸素産生の上昇が確認されたが、コクロディニウムでは何れの刺激物質存在下においても低値のままであった。さらに、韓国近海で分離されたコクロディニウム株についても韓国国立水産科学院の協力を得て検討したが、低レベルの活性酸素であった。

コクロディニウム細胞から調製した水抽出物は HeLa 細胞に対して細胞形態変化を伴う細胞毒性を示した。同様な方法でシャットネラから得た抽出物には細胞毒性は認められなかったことからコクロディニウム特異的細胞毒性物質の存在が示唆された。さらに、ニジマス鰓由来株化細胞 W-1 を用いたコクロディニウム暴露実験を試みた結果、ESM 培地単独に比べ、コクロディニウム細胞浮遊液は明らかに強い細胞毒性を発現した。

スズメダイ暴露実験において、コクロディニウム細胞破壊液では斃死は認められなかったことから毒性発現には生細胞である必要性

が示唆された。さらに、コクロディニウム生細胞暴露時に活性酸素消去酵素である SOD やカタラーゼを添加しても毒性の低下は認められなかったことから、スズメダイの斃死は活性酸素以外の毒性因子によると推定された。

以上、少なくとも本研究に用いたコクロディニウム株に関しては活性酸素産生を介した毒性機構を指示する結果は得られなかった。むしろ何らかの毒性物質の存在の可能性が示唆された。しかしながら、コクロディニウムは人工的環境下での培養に適應することで活性酸素産生能を消失する可能性も否定できず、今後、新たに分離されたコクロディニウム株をできるだけ新鮮な状態で活性酸素産生について検討する必要がある。他の毒性因子の存在の有無についても今後の課題である。

コクロディニウムはその生物学的特徴の1つとして細胞外に大量の粘液物質を分泌しており、その量はシャットネラの十倍以上であったことから、コクロディニウムはこの粘液を介した魚毒性の可能性が示唆された。

最後に活性酸素特異的蛍光試薬を用いた解析を行った結果を図1に示す。上2つは

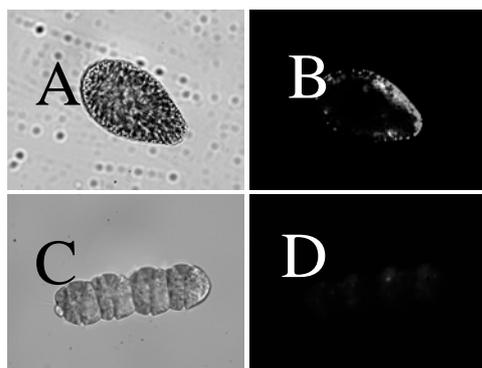


図 1. 蛍光顕微鏡によるシャットネラとコクロディニウムの活性酸素産生の解析

シャットネラ細胞、下2つはコクロディニウム細胞で、左は位相差顕微鏡写真、右は蛍光写真である。シャットネラ細胞では活性酸素に由来する強い蛍光が観察されたが、コクロディニウム細胞ではその様な蛍光は観察さ

れなかった。これらの結果からも、コクロディニウムの活性酸素産生は否定的である。

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 23 件)

1. Y. Zou, Y. Yamasaki, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, T. Honjo, and T. Oda. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae* 9, 2010, 367-373 査読有
2. Y. Yamasaki, S. Nagasoe, M. Tameishi, T. Shikata, Y. Zou, Z. Jiang, T. Matsubara, Y. Shimasaki, K. Yamaguchi, Y. Oshima, T. Oda, and T. Honjo. The role of interactions between *Prorocentrum minimum* and *Heterosigma akashiwo* in bloom formation. *Hydrobiologia* 641, 2010, 33-44 査読有
3. T. Nishikawa, T. Yokose, K. Miyaki, K. Kadomura, Y. Tsukiyama, Y. Yamamoto, K. Yamaguchi, and T. Oda. Pharmacokinetics of orally administered alginate oligosaccharides in the marine fish, sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*), and the possible influence on fish immune system. *J. Food Chem. Safety* 17, 2010, 18-26 査読有
4. 横瀬健、山崎康裕、西川徹、姜澤東、王亜軍、山口健一、小田達也。低分子化アルギン酸オリゴマーの哺乳類培養細胞、単細胞植物プランクトン、及び海洋細菌の増殖に対する影響。日本食品化学学会誌 110, 2010, 27-35 査読有
5. Z. Jiang, T. Okimura, T. Yokose, Y. Yamasaki, K. Yamaguchi, and T. Oda. Effects of sulfated fucan, ascophyllan, from the brown alga *Ascophyllum nodosum* on various cell lines: A comparative study on ascophyllan and fucoidan. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 2010, 113-117 査読有
6. D. Kim, S.-H. Cha, E. Sato, Y. Niwano, M. Kohno, Z. Jiang, Y. Yamasaki, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Evaluation of the potential biological toxicities of aqueous extracts from red tide phytoplankton cultures in in vitro and in vivo

- systems. *J. Toxicol. Sci.*, 35, 2010, 591-599 査読有
7. Z. Jiang, D. Kim, Y. Yamasaki, T. Yamanishi, T. Hatakeyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Mitogenic activity of CEL-I, an N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific C-type lectin, isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* (Holothuroidea). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2010, 1613-1616 査読有
 8. S.-H. Cha, M.-J. Kim, H.-Y. Yang, C.-B. Jin, Y.-J. Jeon, T. Oda, and D. Kim. ACE, γ -Glucosidase and Cancer Cell Growth Inhibitory Activities of Extracts and Fractions from Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata*. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 2010, 437-444 査読有
 9. Y. Wang, K. Osatomi, A. Yoshida, X. Liang, K. Kanai, T. Oda, and K. Hara. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2010, 778-785 査読有
 10. T. Yokose, T. Nishikawa, Y. Yamamoto, Y. Yamasaki, K. Yamaguchi, and T. Oda. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2009, 450-453 査読有
 11. 山崎康裕、小田達也. *Cochlodinium polykrikoides* による魚介類の斃死要因. *日本プランクトン学会報* 56, 2009, 38-42 査読無
 12. D. Kim, Y. Yamasaki, T. Yamatogi, K. Yamaguchi, Y. Matsuyama, Y.-S. Kang, Y. Lee, and T. Oda. The possibility of reactive oxygen species (ROS)-independent toxic effects of *Cochlodinium polykrikoides* on damselfish (*Chromis caerulea*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2009, 613-618 査読有
 13. S. Nakayasu, R. Soegima, K. Yamaguchi, and T. Oda. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2009, 961-964 査読有
 14. Y. Yamasaki, T. Shikata, A. Nukata, S. Ichiki, S. Nagasoe, T. Matsubara, Y. Shimasaki, M. Nakao, K. Yamaguchi, Y. Oshima, T. Oda, 他 4 名. Extracellular polysaccharide-protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community. *The ISME Journal* 3, 2009, 808-817 査読有
 15. T. Yamanishi, T. Hatakeyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. CEL-I, an N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific C-type lectin, induces nitric oxide (NO) production in RAW264.7 mouse macrophage cell line. *J. Biochem.*, 146, 2009, 209-217 査読有
 16. I. Bae, K. Osatomi, A. Yoshida, A. Yamaguchi, K. Tachibana, T. Oda, and K. Hara. Characteristics of a self-assembled fibrillar gel prepared from red stingray collagen. *Fish. Sci.*, 75, 2009, 765-770 査読有
 17. K. Ishibe, T. Yamanishi, Y. Wang, K. Osatomi, K. Hara, K. Kanai, K. Yamaguchi, and T. Oda. Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 2009, 386-389 査読有
 18. 小田達也. 未利用天然資源として有望な赤潮プランクトン. *養殖* 4, 2009, 44-47 査読無
 19. K. Ishibe, K. Osatom, K. Hara, K. Kanai, K. Yamaguchi, T. Oda. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high-virulent and low-virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunology* 24, 2008, 243-251 査読有
 20. T. Nakashima, T. Iwashita, T. Fujita, E. Sato, Y. Niwano, M. Kohno, S. Kuwahara, N. Harada, S. Takeshita, and T. Oda. A prodigiosin analogue inactivates NADPH oxidase in macrophage cells by inhibiting assembly of p47phox and rac. *J. Biochem.* 143, 2008, 107-115 査読有
 21. D. Kim, Y. S. Kang, Y. Lee, K. Yamaguchi, K. Matsuoka, K.-W. Lee, K.-S. Choi, and T. Oda. Detection of

- Nitric Oxide (NO) in Marine Phytoplankters. J. Biosci. Bioeng. 105, 2008, 414-417 査読有
22. D. Kim, Y. Miyazaki, T. Nakashima, T. Iwashita, T. Fujita, K. Yamaguchi, K.-S. Choi, and T. Oda. Cytotoxic action mode of a novel porphyrin derivative isolated from harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. J. Biochem. Mol. Toxicol. 22, 2008, 158-165 査読有
23. Y. Yamasaki, D. Katsuo, S. Nakayasu, C. Salati, J. Duan, Y. Zou, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Purification and characterization of a novel high molecular weight exotoxin produced by red tide phytoplankton, *Alexandrium tamarense*. J. Biochem. Mol. Toxicol. 22, 2008, 405-415 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Y. Zou, Y. Yamasaki, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, T. Honjo, T. Oda. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. 14th International Conference on Harmful Algae. Crete, Greece November 1-5, 2010
2. D. Kim and T. Oda. Molecular mechanism of ROS (reactive oxygen species) generation by unicellular marine phytoplankton *Chattonella marina*. 21th IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shanghai, China. August 2-7, 2009,
3. T. Yoshida, K. Yamaguchi, Y. Yamasaki, D. Kim, Y. Matsuyama, and T. Oda. Comparative proteomics of peridinin-containing light-harvesting complexes among some species of *Heterocapsa*. The 13th International Conference on Harmful algae. Hong Kong November 3-7, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 達也 (ODA TATSUYA)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：60145307

(2) 研究分担者

山口 健一 (YAMAGUCHI KENICHI)
長崎大学・水産学部・准教授
研究者番号：90363473