

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20589002
 研究課題名（和文） 細胞周期解析による赤潮原因藻類の野外における増殖速度の見積もり
 研究課題名（英文） Estimation of *in situ* growth rate of harmful algae using cell cycle analysis
 研究代表者
 片野 俊也 (Katano Toshiya)
 佐賀大学・低平地沿岸海域研究センター・准教授
 研究者番号：00509820

研究成果の概要（和文）：

有害なラフィド藻、*Chattonella* 属および *Heterosigma* 属プランクトンについて、固定方法を確立した。これまで不可能であり細胞周期解析に欠かせない高頻度の *Chattonella* プランクトンのサンプリングを野外にて世界で初めて行った。また、固定方法の確立により、*Chattonella* 属、*Heterosigma* 属プランクトンのフローサイトメーターを用いた細胞周期解析を可能にした。また、*Chattonella* と同様に固定が困難な渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* にもこの固定方法が適用可能であることを確認し、野外での高頻度調査を行った。これによって、*Akashiwo sanguinea* の野外での増殖速度の見積りに世界で初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：

Fixation protocol has been developed for *Chattonella* and *Heterosigma*. We confirmed that this protocol can also apply to naked dinoflagellate of *Akashiwo sanguinea*. And the development of fixation protocol enabled us to analyze cell cycle of these red tide causatives. Using this protocol, field sampling had been carried out for *Chattonella* and *Akashiwo* in two hours interval for 24 hours. For *Akashiwo sanguinea*, we successfully analyzed their *in situ* growth rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	0	1,100,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	480,000	3,180,000

研究分野：水産学一般

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：赤潮、増殖速度、プランクトン、海洋保全、水産

1. 研究開始当初の背景

Dinophyceae, Raphidophyceae に属する赤潮原因藻類には、水産業に深刻な被害をも

たらすものが多い。中でも Raphidophyceae の *Chattonella* 属、*Heterosigma* 属は、活性酸素を発生させることなどにより、養殖魚に

対して多くの被害をもたらしてきた。また、魚類、貝類に対して直接の害は及ぼさない場合であっても、ノリ養殖時期に赤潮を形成する場合、ノリの利用できる栄養塩濃度が低下し、ノリの色落ちを引き起こすことがある。それだけではなく、赤潮は植物プランクトン相の多様性を低下させ、その大発生によって底層の貧酸素化を引き起こすため、間接的に沿岸海洋環境に対して悪影響を及ぼす。沿岸海洋の持続的な利用、適切な管理の側面から、赤潮発生プロセスの解明は、きわめて重要な研究課題である。

九州西部に位置する有明海においては、90年代後半以降、赤潮発生件数が増加している。特に、夏季には、*Chattonella* による赤潮が、頻発している。有明海においては、養殖漁業は盛んではないため、直接の大きな被害は出ていないものの、赤潮時には、天然魚類のへい死がみられることがあり、有明海生態系に良くない影響を与えている。また、有明海で発生した赤潮は、隣接する橘湾に流出しそこで養殖業に被害を与えている可能性もある。

一方、夏ではなく秋口には、渦鞭毛藻の *Akashiwo sanguinea* が赤潮を形成することがしばしば認められている。有明海では、この時期の栄養塩量は、海苔養殖の行方を左右する重要な要素であるため、この時期に赤潮が発生し、栄養塩が消費尽くされるとノリ養殖に大きな被害を及ぼす。現在、これらの夏季、秋季の赤潮発生を抑える海洋環境管理のあり方が求められている。

赤潮原因藻類には、単細胞で遊泳性を持つものが多くあり、それらの一部は日周鉛直移動を行うことが知られている。しかし、日周鉛直移動を行なうため、現場培養法による増殖速度の推定ができない。そのため、日周鉛直移動を行う赤潮藻類の野外における増殖速度は、基礎的な情報にかかわらず、いまだに十分な情報の蓄積がなかった。

2. 研究の目的

本研究では、野外での昼夜観測と細胞周期解析を組み合わせることによって、1) 赤潮藻類の日周鉛直移動を明らかにする。2) 日周鉛直移動を行なう赤潮藻類細胞の現場における増殖速度を求める、ことを目的とした。これにより、赤潮の増殖過程をその移動パターンとともに詳細にしらべ、

赤潮発生メカニズムの究明に貢献しようとするものである。

主要な対象種は、ラフィド藻の *Chattonella antiqua*、*Heterosigma akashiwo*、渦鞭毛藻の *Akashiwo sanguinea* の3種とした。これらは、有明海において、夏季から秋季にかけて頻繁に赤潮を形成する種である。調査対象海域は、主に有明海とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、固定方法に関して技術的な課題を克服する必要がある。*Raphidophyceae* の *Chattonella* 属、*Heterosigma* 属は、細胞膜が脆弱なため固定すると、細胞が壊れたり、また細胞同士が接着し、細胞ごとのDNAをはかることが困難になる。従って強固に固定する方法の考案が求められる。そこで、本研究では、まず固定方法の確立をおこなった。固定液には、固定剤としてグルタルアルデヒドとホルムアルデヒドを採用した。その緩衝材として、リン酸バッファー、カコジル酸、Hepes の3種類を検討した。また、浸透圧調整にはグルコースを用いた。生物試料には、*Chattonella antiqua* を用いて、上記3種類の緩衝材を比較した。この固定方法は、*Heterosigma akashiwo*、*Akashiwo sanguinea* にも適用し固定できることを確認した。

確立された固定方法を用いて、野外調査を4回行った。3回は、*Chattonella antiqua* の赤潮で、残りの1回は、*Akashiwo sanguinea* の赤潮が発生していた。いずれの調査においても、午前8時から2時間おきに24時間の昼夜観測を行なった。毎回の調査時には、鉛直方向に採水を行った。得られたサンプルは固定して、研究室に持ち帰った。で調査船(備船)を用いた昼夜調査により、3-6時間の一定間隔で赤潮藻類のサンプリングおよび固定を行った。得られたサンプルについて、細胞周期解析し、その結果からの増殖速度を算出した。

Chattonella に関しては、室内において、細胞周期解析実験を行った。培養株は、有明海から分離された株を用いた。培養温度は、27度、14時間明、10時間暗の条件で培養を行い、2時間沖にサンプリングを行った。サンプルの細胞密度を計数するとともに、細胞周期をフローサイトメーターを用いて、調

べた。

4. 研究成果

固定方法の開発

新たな固定方法を開発した。緩衝材としては、リン酸バッファーではよい固定結果が得られなかったが、カコジル酸、Hepes を用いた場合には、どちらも、細胞の形態もよく保存された。カコジル酸は、砒素を含むため固定剤、固定後の試料の扱いには十分な注意が必要とされる、一方 Hepes はそれ自体は細胞培養に用いられる緩衝材であり無害なため、その点においてすぐれている。(もちろん、固定剤に含まれるグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドについては、適切な処理が要求される) また、この固定方法では、細胞数の損失がほぼないことも確認された。さらに、固定後 5 1 日間の保存の後にも計数値には、大きな低下は見られなかった。この固定方法に従って固定した *Chattonella* 細胞について、フローサイトメーターにより細胞あたりの DNA の定量をおこなったところ、分析に成功した。この固定方法は、同じラフィド藻の *Chattonella*, *Heterosigma* と渦鞭毛藻の *Akashiwo* にも適用可能であることを確認した。

Chattonella の日周鉛直移動

開発された固定方法を用いて、野外において 2 時間おきに試料を固定、保存し、日周鉛直移動を、明らかにした。2008 年 8 月、2009 年 7 月、2009 年 9 月、2010 年 7 月の 4 回において、*Chattonella* ブルームの昼夜観測に成功した。その結果、4 回の観測中、3 回の観測において、昼は水深 0 から 0.5 m 層に、夜間には、4-6 m 層に分布する日周鉛直移動を行なうことを明らかに出来た。これまで瀬戸内海で調べられた例と比較すると夜間の分布水深が、やや浅い傾向にある。また、下方へ移動する時間は午後 2-4 時の間に開始されること、夜間の分布は昼間に比べると特定水深へ集中分布することがないこと、下層から上方への移動は、午前 2-4 時に開始されること、移動は必ずしも同調していないこと、が明らかになった。これまでの 4 回の調査においては、無機態窒素濃度が、高い場合 (7 μ M 以上) でも日周鉛直移動を行なうことが明らかになった。従って、*Chattonella* が、鉛直移動を行なうか否

かには、栄養塩濃度は関係ないことがわかった。

Chattonella の細胞周期

Chattonella の細胞周期解析については、室内実験においておこなった。これまでの結果、*Chattonella* は、最大で一日に 2 回細胞分裂をおこなうことがわかってきた。また、細胞分裂は、夜間に限られることもわかってきた。

Akashiwo sanguinea の日周鉛直移動と現場増殖速度

Akashiwo sanguinea については、2009 年の 8 月の野外調査において、日周鉛直移動に加えて増殖速度の見積りをおこなうことに成功した。日周鉛直移動は、*Chattonella* とわずかに異なり、昼間は水深 1.2 m に夜間は水深 4 m に分布した。昼間の分布水深は、*Chattonella* に比べると深く、夜間の分布水深は、逆に浅かった。従って、*Chattonella* と比べると *Akashiwo* は鉛直方向の移動距離は、短いことがわかった。細胞分裂頻度については、室内においても培養実験を行った。その結果、細胞分裂は、室内、野外どちらにおいても、明から暗へ移行する時間帯に起きた。細胞分裂に要する時間は 1.3 時間と見積もられた。また、有明海における調査期間中の増殖速度は、0.45 /day であり、一日に 0.5 倍程度増えていたこともわかった。

まとめ

本研究によって、赤潮原因藻類 *Chattonella* と *Akashiwo* について、有明海における日周鉛直移動パターンを明らかに出来た。*Chattonella* については、日周鉛直移動を行なうかどうかには、栄養塩濃度は関係ないことがわかった。一般に、*Chattonella* は、珪藻が海面近くの栄養塩を消費しつくした後に、珪藻が利用できない深い層の栄養塩を利用しながら、次第に *Chattonella* が増殖することが知られているが、深い層の栄養塩を摂取する目的で移動しているわけではなく、結果として、深い層の栄養塩を利用して増殖していると言うことを意味する。

Akashiwo は昼間の分布水深が *Chattonella* よりも深かった。海面近くでは一般に、強光や紫外線による光合成の障害がおきることが知られているが、これを避けているのかもしれない。これについては、今後の研究を待た

ねばならない。昼間に海面直下に分布することから、ブルームの発達を捉えるためには、海面の目視による観測だけでは、*Akashiwo*による大増殖を見逃す可能性があることを意味している。

本研究によって、細胞分裂タイミングについても明らかになった。*Chattonella*は夜間に、*Akashiwo*は夕方から夜間に細胞分裂をおこなうことがわかった。種によって、細胞分裂のタイミングは微妙に異なるが、本研究で扱った日周鉛直移動を行なう種類は、昼間には分裂をおこなわないのかもしれない。本研究では、日周鉛直移動を行なう赤潮原因藻類のブルームピーク時の増殖速度測定について方法を確立することが出来た。ただし、ブルームが発達するかどうか、赤潮（海面が着色するほど）が形成されるほど個体群が増殖できるかどうか、を調べるためには、もっと細胞密度が低い時点での増殖速度の測定が、重要になってくる。この点については、本研究では、おこなうことが出来なかったため、今後の課題としてあげることが出来る。

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3件)

① Katano, T., Yoshida, M., Yamaguchi, S., Hamada, T., Yoshino, K., Hayami, Y. (in press) Diel vertical migration and cell division of bloom-forming dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* in the Ariake Sea, Japan. *Plankton and Benthos Research* 査読有

② Baek, S.H., You, K., Katano, T.*, Shin, K. (2010) Effects of temperature, salinity, and prey organisms on the growth of three *Pfiesteria*-like heterotrophic dinoflagellates. *Plankton and Benthos Research* 5:31-38 *corresponding author 査読有

③ Katano, T., Yoshida, M., Lee, J., Han, M.-S., Hayami, Y. (2009) Fixation of *Chattonella antiqua*, and *C. marina* (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light

microscopy. *Phycologia* 48:473-479 査読有

[学会発表] (計4件)

① 片野俊也、吉野健児、松原賢、速水祐一 河川からの出水直後のラフィド藻 *Chattonella* のブルーム 日本海洋学会 (みなし開催) 2011年3月23日 千葉県柏市

② 片野俊也、吉田誠、山口創一、濱田孝治、吉野健児、速水祐一 有明海における渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* の細胞分裂頻度からの増殖速度の見積り 日本プランクトン・ベントス学会 2010年10月10日 千葉県柏市

③ 片野俊也、吉田誠、山口創一、速水祐一 ラフィド藻 *Chattonella* の日周鉛直移動 日本海洋学会 2010年3月27, 29日 東京都品川区

④ Lee Juyun, 片野俊也、速水祐一、Han Myung-Soo *Heterosigma akashiwo* の細胞周期解析：細胞分裂のタイミングと日周鉛直移動の関係 日本海洋学会 2008年9月25日 広島県呉市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野 俊也 (Katano Toshiya)

佐賀大学・低平地沿岸海域研究センター・准教授

研究者番号：00509820

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし