

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19213

研究課題名（和文）赤潮藻類の新規増殖制御因子としての一酸化窒素の機能評価

研究課題名（英文）Function of nitric oxide as a new growth regulator of red tide algae

研究代表者

武田 重信（TAKEDA, Shigenobu）

長崎大学・水産・環境科学総合研究科（水産）・教授

研究者番号：20334328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生体内のシグナル伝達分子である一酸化窒素（NO）が海洋植物プランクトンの新規の増殖制御因子になり得るかどうかを検討するため、表層海中での亜硝酸塩からの光化学的なNO生成を模擬した培養液量可変の反復式流加培養実験システムを構築して、異なるNO濃度環境における赤潮藻類の増殖応答を調べた。

珪藻Skeletonemaおよびラフィド藻Chattonellaの増殖は、沿岸域表層でみられるようなNO供給速度においてほぼ完全に阻害されたが、NOに対する感受性には種差が認められた。従って、富栄養な沿岸域の表層海中で生成するNOは、植物プランクトンの増殖抑制因子となる可能性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の多様な生理過程におけるシグナル伝達分子としての重要性が認識されている一酸化窒素（NO）が、本研究により、海洋植物プランクトンの新たな増殖抑制因子となる可能性が明らかになった。このことから、赤潮藻類によるブルームの発達・衰退過程や海洋一次生産の変動を解析する上で、NOの影響を考慮することの重要性が示された。それらの知見は、赤潮の新規防除技術の開発だけでなく、海洋の窒素循環および植物プランクトン動態の理解とそれらの研究展開にも、新たな展開をもたらすと予想される。また、海洋生態系内におけるNOを介した生理的作用に関する研究や、大気海洋間のNO相互作用などの学際研究の創出も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a variable-volume repeated fed-batch culture system was employed to simulate the NO supply rate in the laboratory and determine the growth responses of coastal phytoplankton. The growth rates of the diatom *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex and raphidophyte *Chattonella marina* were almost completely inhibited at average NO supply rates of 28 and 1.4 pM/s, respectively, indicating species differences in sensitivity to NO. These results suggest that phytoplankton growth may be sufficiently inhibited by NO produced through photochemical reactions in surface seawater. Therefore, in eutrophic waters with relatively high nitrite concentrations, the effect of NO on altering the abundance of phytoplankton species as well as the occurrence and disappearance of red tides should be considered.

研究分野：水産海洋学

キーワード：赤潮 一酸化窒素 海洋生態系 窒素循環 植物プランクトン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 一酸化窒素 (NO) は、生体内で細胞増殖、アポトーシスなど様々な生理機能を有しており、生理過程におけるシグナル伝達の重要な情報分子の一つとして認識されている。1996 年以降、NO の植物への影響にも注目が集まり、シグナル分子としての NO が、高等植物の代謝、生長、発達、成熟、老化を調節し、植物が NO に反応するだけでなく、植物自身も NO を生産することも知られていた。

(2) 海洋窒素循環における NO の発生源としては、微生物による硝化や脱窒などの生物過程が想定されるものの、硝化は光によって抑制され、脱窒は酸素の存在によって阻害される。そのため海洋表層では、亜硝酸塩からの光化学的な NO 生成反応 $[NO_2^- + HOH + h\nu \text{ (紫外線)} \rightarrow NO + OH + OH^-]$ が主要な供給プロセスであることが報告されている (Zafiriou et al., 1980)。

(3) 海洋表層水中の NO 濃度は、外洋域よりも亜硝酸塩が豊富な沿岸域で高くなる傾向にあり、瀬戸内海では 20 ~ 200 pM の値を示す (Adesina and Sakugawa, 2021)。一方、植物プランクトンに対する NO の影響を調べた過去の実験では、nM から μM レベルの高濃度 NO を 1 日 1 ~ 2 回の頻度で添加したときに、増殖が促進あるいは抑制されたとの報告があった (Zhang et al., 2003, 2005)。しかし、これらの実験における NO 濃度条件は、天然海域における濃度の 10 ~ 100 倍以上と極めて高く、自然環境の濃度レベルの NO が、植物プランクトンに対してどのような影響を及ぼすのかについては不明であった。その背景として、海洋表層の NO 濃度が他の溶存無機窒素と比べて低いことに加えて、NO はフリーラジカルであるが故に反応性が高く短寿命であり、実験系内の NO 濃度を安定的に制御することが難しいという課題があった。

(4) 海洋生態系を一次生産者として支えている植物プランクトンの増殖に及ぼす NO の影響や、赤潮藻類によるブルームの発達・衰退と NO の関わりについて、海洋現場の NO 濃度レベルで明らかにすることができれば、海洋の窒素循環および植物プランクトン動態を理解するための新たな視座が得られ、赤潮の防除技術の開発など、今後の研究の方向性に大きな転換をもたらすと期待されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、生体内の多様な生理過程におけるシグナル伝達分子としての重要性が認識されているにも関わらず、海洋生態系における機能の解明が未着手である NO に着目し、NO が海洋植物プランクトンの新規の増殖制御因子になり得るかどうかを明らかにすることを目的とした。これにより、海洋表層における NO の生成や消失が赤潮藻類のブルームの発達・衰退に及ぼす可能性を評価し、海洋窒素研究の新たな視座の創出に寄与することを目指した。

(2) まず、亜硝酸塩濃度が高い沿岸海域で日中に見られるような pM/s レベルの NO 供給フラックスを実験室内で再現するため、培養液量可変の反復式流加培養実験システム (VRFB 培養系) を新たに構築することに取り組んだ。

(3) 次に、開発した培養実験システムを用いて、沿岸域で赤潮を形成する代表的な植物プランクトン 2 種を対象に、複数の濃度段階での NO 供給に対する増殖応答について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 植物プランクトンは、赤潮形成種として知られている珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex (NIES-323) および ラフィド藻 *Chattonella marina* (NIES-113) の培養株を用いた。培養には、f/2 培地を用い、温度 20 °C、光量は $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗サイクルは 14 時間:10 時間とした。

(2) VRFB 培養系は、ペリスタルティックポンプを用いた NO 供給溶液の送液システムと、植物プランクトン細胞培養液を入れるサイドアーム付き 1-L ガラス製培養フラスコで構成される (図 1)。NO 供給溶液は、窒素ガスでパージして溶存酸素を除去した f/2 培地 (500 mL) に、一定量の NO 飽和水溶液を加えてを調製した。NO 飽和水溶液の添加量は、0.4、1.7、6.6 mL あるいは 0.4、0.8、1.7 mL の 3 段階とした。対照区として、NO を含まない脱酸素した f/2 培地を送液する実験系を設けた。照明付き恒温インキュベーター内に設置した培養フラスコには、濾過滅菌した f/2 培地を 1 L 入れて、植物プランクトン培養株を一定量接種した。培養フラスコ内にはインペラーが付いており、マグネチックスターラーで 16 rpm で回転させた。NO 供給溶液は、明期の開始前に毎日作成し、明期の 14 時間に 0.5 mL/min の流量で連続供給した。その後、暗期の終わりに 420 mL の培養液を培養フラスコから回収して、フラスコ内の液量を 1 L に戻した。このような明期の NO 供給溶液の送液と、暗期の終わりの培養液の回収を、3 回繰り返した。

(3) 植物プランクトン増殖のモニタリングは、暗期の終わりに回収した培養液中の細胞数を倒立光学顕微鏡で計数するとともに、生体内クロロフィル蛍光を蛍光光度計 (Trilogy, Turner Designs) で測定することにより行った。これらの値は、培養フラスコ内に送液された NO 供給溶液による希釈倍率で補正した。NO 供給溶液中の NO 濃度の測定には、NO センサー (ISO-NOPF200) を備えたフリーラジカルアナライザー (TBR4100, World Precision Instruments) を用いた。

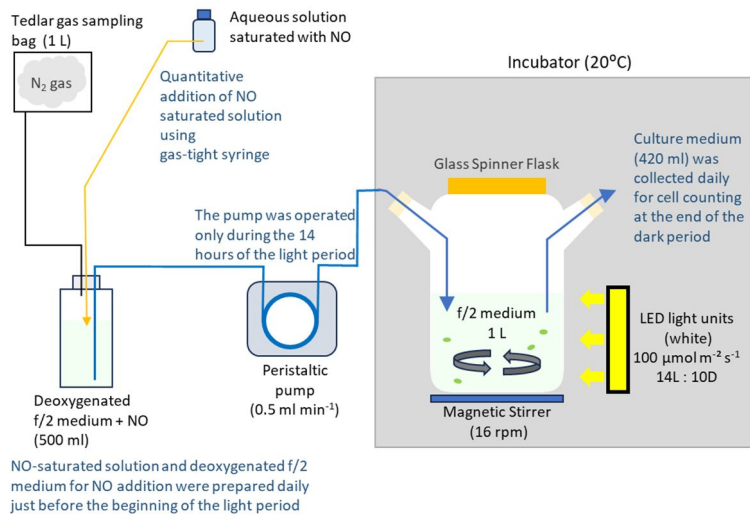


図1 培養液量可変の反復式流加培養実験システム (VRFB 培養系) の模式図

4. 研究成果

(1) NO 供給系を備えた培養液量可変の反復式流加培養実験システム (VRFB 培養系) の構築
 本研究で構築した VRFB 培養系において、NO 供給溶液は 14 時間の明期に培養フラスコに連続的に送液されたが、NO 供給フラックスは送液開始時が最も高く、その後は時間の経過とともに徐々に低下する傾向を示した。低、中、高の 3 つの NO 濃度段階における平均 NO 濃度は、それぞれ 186、712、3920 nM であった。NO 供給溶液のポンプ送液流量、1 時間毎の NO 濃度、培養容器内の培養液の総容積から、低、中、高の濃度段階における 14 時間平均の NO 供給フラックスは、それぞれ 1.4、5.4、28 pM/s と見積もられた。また、培養液中の NO 定常濃度 (14 時間平均) は、それぞれ 5.6、21、110 pM であった。沿岸域の表層水中では、光化学的 NO 生成速度が約 0.7 ~ 39 pM/s、NO 定常濃度は 12 ~ 260 pM の範囲にあることが報告されている (Adesina and Sakugawa 2021)。これらは本研究で得られた値と同等であり、室内の培養実験系で自然環境の NO 濃度レベルを再現するという目標は達成された。但し、本研究では海洋の現場で観察される NO 濃度の日周変動パターンは再現されていない。今後、供給溶液中の NO 濃度をリアルタイムで高感度連続測定できるようになれば、NO 供給溶液のポンプ送液流量を自動制御して、太陽光強度に応じた自然の NO 濃度の増減をより正確に再現できるようになると期待される。

(2) NO 供給に対する植物プランクトンの増殖応答

VRFB 培養系を用いて *Skeletonema* 培養株を 3 日間培養し、平均 NO 供給フラックス 1.4、5.4、28 pM/s における増殖応答を調べたところ、対照区 (NO 無添加) と比べて、NO 供給フラックスの増加とともに細胞数が少なくなり、NO 供給フラックス 5.4 pM/s 以上で増殖が強く阻害された (図 2)。また細胞の比増殖速度は各 NO 供給フラックスに対して、それぞれ対照区の 93%、38%、8% となり、NO 供給フラックス 28 pM/s では増殖がほぼ停止した。一方、*Chattonella* 培養株では、NO 供給フラックス 1.4 と 2.5 pM/s においてほとんど増殖が認められず、5.4 pM/s では細胞数が培養開始時よりも徐々に減少して、比増殖速度はマイナスとなった (図 2)。

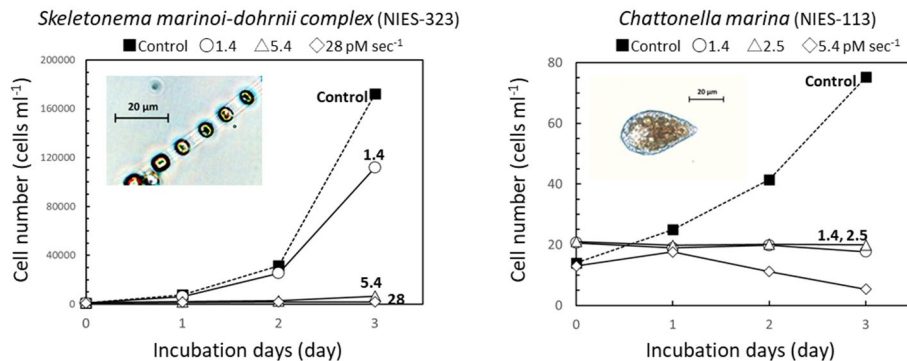


図2 異なる NO 供給フラックスでの 3 日間の培養における珪藻 *Skeletonema* および ラフィド藻 *Chattonella* の細胞数の変化。各培養株の顕微鏡写真を枠内に示す。

以上の結果から、明期の間に低濃度 (pM レベル) の NO を連続的に供給すると、これら 2 つの沿岸性植物プランクトン培養株の増殖を強く阻害すること、増殖阻害の閾値は *Skeletonema* 培養株よりも *Chattonella* 培養株の方が低いことが分かった。従って、沿岸域で見られるような pM

レベルの NO の連続供給によって、植物プランクトンの増殖が阻害されることが初めて明らかになった。すなわち、植物プランクトン種によって NO 感受性が異なるものの、NO が海洋における植物プランクトンの増殖阻害因子として無視できないことが示された。また、今回の実験において NO は明期のみ供給されたことから、NO が植物プランクトンの光合成系に一定の影響を及ぼすことが示唆された。海洋の現場における強い太陽光や豊富な栄養塩などの環境条件は、植物プランクトンの光合成に有利であるが、同時に海洋表層での光化学的 NO 生成を促進する。そのため、光と栄養塩のプラス効果と、NO による植物プランクトン増殖阻害のマイナス効果のバランスを考慮する必要がある。藻類種間の NO に対する感受性の違いが、植物プランクトン群集の組成や存在量の変化、赤潮の発生に影響を与える要因の一つとなっている可能性も考えられる。

(3) NO 供給終了後の植物プランクトン増殖の回復

NO による増殖阻害からの回復を調べるため、3 日間の NO 供給終了後、植物プランクトンのバッチ培養を継続して増殖の様子を数日間モニターした。5.4 および 28 $\mu\text{M/s}$ の NO 供給フラックスに 3 日間曝された後の *Skeletonema* 培養株の比増殖速度は、培養 5 日目、すなわち NO 供給終了から 2 日目以降に明らかに増加した。同様に、*Chattonella* 培養株の比増殖速度は、NO 供給終了後 1~2 日で増加し始め、対照区と同程度までになった。これらの結果は、NO による増殖阻害の程度にかかわらず、NO 供給が無くなると植物プランクトンの増殖は短期間で回復することを示しており、NO は細胞の代謝に深刻なダメージを与えるものではないと考えられる。また、NO による増殖阻害からの回復能力の種間差は、植物プランクトン群集内における種間競争を複雑にしている可能性がある。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

本研究の結果は、光化学反応による亜硝酸塩からの NO 生産が活発な沿岸域において、NO が植物プランクトンの増殖の重要な調節因子になっていることを示している。十分な光と栄養塩が存在し、鉛直的な成層構造が安定しているにも関わらず、植物プランクトンの増殖が見られない場合は、光化学的 NO 生産の基質である亜硝酸塩の濃度レベルを調べる必要がある。その際、種による NO 感受性の違いは、沿岸の植物プランクトン群集における特定の藻類種の優占を説明する要因となることから、今後、より広範な植物プランクトン種における NO 感受性の比較研究が求められる。また、NO が植物プランクトンの増殖を抑制するメカニズムについては、光合成系との関連性が疑われるが、植物プランクトンの網羅的な遺伝子発現解析などによって明らかにしていく必要がある。なお、富栄養な沿岸域以外にも、NO が植物プランクトンの増殖に影響を及ぼす可能性のある候補海域として、亜硝酸塩を豊富に含む亜表層水が表層に移送される湧昇海域や、鉄欠乏ストレスを受けた植物プランクトン細胞から亜硝酸塩が放出され易い太平洋赤道域などの高硝酸塩、低クロロフィル (HNLC) 海域が挙げられる。これらの海域において NO が植物プランクトン群集の動態にどの程度の影響を及ぼしているのかについては、今後の重要な検討課題である。

< 引用文献 >

- Adesina A.O., Sakugawa H., 2021, Photochemically generated nitric oxide in seawater: The peroxyxynitrite sink and its implications for daytime air quality, *Science of The Total Environment*, 781,146683, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146683.
- Zafiriou O.C., McFarland M., Bromund R.H., 1980, Nitric oxide in seawater, *Science*, 207,637 - 639.
- Zhang Z.B., Lin C., Liu C., Sun M., Ding H., 2003, The effect of nitric oxide on the growth of marine phytoplankton, *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2, 185 - 188.
- Zhang Z.B., Lin C., Liu C., Xing L., Wu Z.Z., Sun F., 2005, Study on patterns and chemical features of NO effect on marine phytoplankton growth, *Science in China Series B: Chemistry*, 48, 376 - 384.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shigenobu Takeda
2. 発表標題 Importance of nitric oxide as a growth regulator of coastal phytoplankton
3. 学会等名 Ocean Sciences Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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