

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440248

研究課題名(和文) 赤潮原因藻類の鉄取り込みメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of iron uptake mechanism by red tide causing-microalgae

研究代表者

内藤 佳奈子 (NAITO, KANAKO)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：00453217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工合成培地を用いた無菌培養実験により、赤潮原因藻類の増殖における鉄利用能の検討を行った。その結果、ノリ色落ち原因珪藻*Eucampia zodiacus*と有害渦鞭毛藻*Cochlodinium polykrikoides*の利用鉄種と有機配位子の産生能を明らかにした。また、主要な赤潮藻8種の最小細胞内鉄含量を求め、現場海域における増殖可能な細胞密度と他種との競合における優位性を評価した。瀬戸内海沿岸域の調査研究では、有害赤潮藻類の細胞密度と溶存鉄濃度との間の相関性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Iron is essential trace metal for microalgal growth. In axenic culture experiment using a chemically-defined synthetic medium, we examined iron availability for the growth of red tide microalgae. The results showed that iron species used for growth and production of organic ligands such as siderophore by harmful diatom *Eucampia zodiacus* and harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. And we investigated the minimum iron quota in the cell of eight kinds of main red tide algae and evaluated the permissive cell density and the superiority in the competition with other algal species in coastal area. In the research of coastal area in the Seto Inland Sea, there was a correlation between cell density of harmful red tide algae and concentration of dissolved iron.

研究分野：微細藻類学

キーワード：赤潮 鉄 微細藻類 増殖 播磨灘 広島湾 人工合成培地

## 1. 研究開始当初の背景

赤潮は、原因となる微細藻類が著しく高い密度まで増殖した状態にあるので、その増殖を支える栄養条件が第一に必要な条件といえる。したがって、赤潮原因藻類の栄養要求や増殖の動力学的特性等の栄養生理を理解することは、発生機構を解明する上で重要な課題である。

赤潮などの微細藻類が大量発生する海域では、多量栄養素である窒素やリンに対して相対的に鉄が不足しやすくなっている。その鉄不足は、微細藻類による栄養塩の利用を制限する。したがって、赤潮発生において制限要因となりうる鉄の微細藻類による利用特性を明らかにすることは、とりわけ重要な研究課題である。

微細藻類の鉄利用能に関する研究では、水溶液中の組成と濃度を完全に把握できる化学合成培地が必須である。しかしながら、これまでに創案された人工海水ベースの合成培地では、赤潮藻類の多くは増殖不可能であった。

報告者らは赤潮を形成する 21 種の主要な藻類に対して、人工合成培地 (IHN 培地) を開発し、日周鉛直移動の特性をもつ渦鞭毛藻や珪藻、クリプト藻の 6 藻種が粒子態のリン酸鉄もしくは硫化鉄を増殖に利用可能であることを明らかにした。さらに海水中に存在する有機態の鉄についても、利用鉄種と有機配位子の濃度による増殖への影響を示した。しかし、これらの利用鉄種がどのようなメカニズムで細胞内に取り込んでいるかは解っていない。

また、西日本沿岸域において優占種となるにも関わらず、上記の IHN 培地でも無菌培養が困難であった有害珪藻 *Eucampia zodiacus* と有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* に対して、増殖可能となる人工合成培地の開発に成功している。これらの主要な有害藻を加えた多種の赤潮藻類について、増殖制限因子となりうる微量鉄の取り込み戦略を解明することにより、藻類大量発生メカニズムの一端を明らかにできる。

## 2. 研究の目的

本研究では、赤潮原因藻のまだ解明されていない鉄に関する基礎的な増殖生理研究について、多種の赤潮藻に対する鉄取り込み機構の解明と実海域における鉄スペシエーション (存在する濃度と化学形態) に関する研究を行い、赤潮藻類がどのようなメカニズムにより利用鉄種を取り込み、沿岸域において大量発生しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 鉄利用における取り込みメカニズムの解明

完全合成培地で新たに培養可能となった赤潮種に対して利用可能な鉄種を明らかに

する。また、鉄不足状態での取り込み戦略として鉄輸送体シデロホア産生能を検討する。

### ユーカンピアとココロディニウム増殖への利用鉄種の解明

有害赤潮藻 *E. zodiacus* と *C. polykrikoides* に対して増殖可能な完全合成培地を用いて各鉄種 (有機鉄錯体、無機鉄錯体) を添加した条件を設定し、人工気象器内にて培養を行った。In-Vivo 測定法を用いたクロロフィル測定装置による多検体の蛍光値 (増殖量) を測定し、対象種の増殖における利用鉄種を明らかにする。

### 増殖における鉄要求量の検討

赤潮藻 8 種の無菌株 *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex NIES-324, *Chaetoceros lorenzianus*, *Ditylum brightwellii*, *Coscinodiscus wailesii*, *Karenia mikimotoi*, *Heterocapsa circularisquama*, *Heterosigma akashiwo*, *Eutreptiella gymnastica* を用いた。通常培地の 1/10 量の鉄濃度培地にて前培養を行い、対数増殖期後期の培養液をポリスチレンチューブ内の多段階鉄濃度設定培地に 1/50 量接種し、人工気象器内で培養した (光量 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Light : Dark = 14 h : 10 h, 温度 20 or 25  $^{\circ}\text{C}$ )。日々、*in vivo* 蛍光値を測定することにより、各赤潮藻の増殖における鉄要求性を評価した。

### 多種の赤潮藻類によるシデロホア産生の検出

シデロホア産生の検出には、構造に依存しない普遍的な高感度の化学的方法である Chrome azurol S (CAS) assay method を改良した検出法を使用した。

### (2) 実海域における溶存鉄と優占種の関連性の把握

広島湾および播磨灘における現場調査と海水サンプリングを月 1 回の頻度で行った。各層の採水は、内面テフロンコートニスキン-X 採水器を用いて行い、水温と塩分は塩分計により現場で測定した。海水中の鉄濃度は、フェロジン法を用いた長光路フローセル分光器による吸光度分析で測定した。植物プランクトン種組成については倒立顕微鏡を用いて測定し、栄養塩 (窒素、リン、ケイ素) 濃度はオートアナライザー分析にて測定した。また、播磨灘海水については、ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂固相抽出カラム (NOBIAS, CHELATE-PA1) にて脱塩濃縮をした後、ICP 発光分光分析装置により溶存態の微量金属 (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo) についても測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 鉄利用における取り込みメカニズムの解明

-1. ユーカンピア増殖への利用鉄種の解明  
有機キレーターとして検討した有機酸 7 種 (酢酸, クエン酸, 乳酸, リンゴ酸, EDTA,

フミン酸、フルボ酸)の存在下において、供試藻の増殖を確認することができた。一方、3 価の鉄との高い錯生成能を持つ微生物シデロホアであるフェリオギザミンBを添加した培地では、増殖は認められなかった。また、本種の無菌株に対する人工合成培地の開発に成功しており、低濃度における栄養塩や微量金属などの利用・摂取特性が明らかになると期待できる。

## -2. コクロディニウム増殖への利用鉄種の解明

*C. polykrikoides* (INO76 株および KMY438 株) 2 株について検討した。供試藻の両株ともに完全人工合成培地で良好な増殖を示し、溶存態の無機 Fe のみならず、腐植物質などの有機酸をキレーターとする有機 Fe をも増殖に利用できることが分かった。ただし、株間によって異なる有機態の Fe 利用特性を示した。一方、微生物シデロホアであるフェリクロム、フェリオギザミンBを添加した培地では両株ともに増殖が認められなかった。

これらの結果から、沿岸海域に溶存しうる有機配位子は Fe スペシエーションに影響を与え、両藻種の増殖を左右しうることを示唆された。

## 増殖における鉄要求量の検討

各鉄濃度培地における最大細胞収量と培養開始時の溶存態鉄濃度より算出した各赤潮藻種の最小細胞内鉄含量を比較すると、*S. marinoi-dohrnii complex* は細胞サイズが小さいにも関わらず大きな値を示し、他 7 藻種に比べて増殖に対する鉄要求性が高いことが示唆された。また、栄養塩が十分に存在している海水中に鉄が 100 nM 溶けていると仮定した場合の増殖可能な細胞密度を比較してみると、*C. lorenzianus* が最も高く、上記条件に該当する海域でこれら 8 藻種が競合した際には本種が優占種になりうると思われた。

本実験によって、主要な赤潮藻種について鉄要求量が明らかとなったことから、沿岸海水中の鉄濃度から発生あるいは細胞密度の予知予察が可能となった。

## 多種の赤潮藻類によるシデロホア産生

検討した全藻種において、0.2  $\mu\text{M}$  以上の CAS 反応性物質が検出された。この結果からシデロホアのような有機配位子を介した赤潮藻類の鉄取り込み機構が考えられる。

## (2) 実海域における溶存鉄と優占種の関連性の把握

播磨灘では、大型珪藻の *Eucampia zodiacus*、小型珪藻の *Chaetoceros* spp. が 2014 年 12 月から 2015 年 4 月の灘奥表底層に出現しており、それに伴う溶存態の無機窒素 DIN、ケイ素 DSi 濃度の減少が認められた。一方、広島湾では同時期での *E. zodiacus* の出現はあまり見られず、2014 年 8 月に有害渦鞭毛藻の *Karenima mikimotoi* が  $622 \text{ cells ml}^{-1}$  出現し、DIN と DIP 濃度は低い値を示した。また、表中層での DIP 濃度とアルカリフォスファターゼ (AP) 活性

量との間に負の相関関係が認められ、とくに表層では植物プランクトン細胞密度と AP 活性量との間に正の相関があることが明らかになった。

2015 年 5 月から 2016 年 2 月において、播磨灘の灘奥、灘央ともに *Chaetoceros* spp. と *Skeletonema* spp. が優占種であった。また、灘奥において、*E. zodiacus* の細胞密度と各微量元素の濃度を比較してみると、灘奥の底層において、Fe、Zn、Mn との間に負の相関性が認められた。さらに大型珪藻 *Eucampia zodiacus* が 2016 年 1 月より出現しており、それに伴う DFe 濃度の減少が確認されたことから、本種による海水中の DFe 消費の可能性が考えられた。一方、広島湾では 2015 年 6 月表中層において *H. akashiwo* が高密度に発生し、DFe 濃度との関連性が示唆された。

これらの結果より、両海域ともに主要な赤潮原因藻類の発生に鉄が大きく関与している可能性が示された。

## 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 5 件)

増山悦子、粟屋良亮、内藤佳奈子、中村健一、河床石バイオフィルム酵素活性に影響を及ぼす河川環境要因、陸水研究、査読有、5、2017、印刷中。

内藤佳奈子、檀上志帆、清田忠志、河尻義孝、坂本節子、阿部和雄、吉永郁生、広島湾海水中の植物プランクトン増殖に及ぼす鉄溶出施肥材の影響、県立広島大学生命環境学術誌、査読有、9、2017、1-7。  
内藤佳奈子、本田達志、増山悦子、中村健一、熊野池における植物プランクトンとアルカリフォスファターゼの季節変化、県立広島大学生命環境学術誌、査読有、7、2015、19-29。

Hiroshi Hasegawa, Koichi Nakagawa, M. Azizur Rahman, M. Takemura, Teruya Maki, Kanako Naito and M. Mamunur Rahman, A fluorescent-based HPLC assay using 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole as derivatization agent for the determination of iron bioavailability to red tide phytoplankton, Chromatographia, 査読有, 78, 2015, 65-72.  
内藤佳奈子、有害有毒プランクトンの簡易検出・同定法、ぶんせき、5、査読無、2016、73-81。

### [学会発表](計 18 件)

檀上志帆、内藤佳奈子、清田忠志、河尻義孝、坂本節子、阿部和雄、吉永郁生、広島湾海水中の植物プランクトン増殖に及ぼす施肥材の影響、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京都品川区)

内藤佳奈子、甲斐和佳、谷口典、三戸彩絵

子、久米洋、坂本節子、宇和海における *Karenia mikimotoi* と栄養塩及び微量金属の分布、平成28年度日本水産学会秋季大会、2016年9月9日、近畿大学（奈良県奈良市）

甲斐和佳、内藤佳奈子、三戸彩絵子、宮原一隆、坂本節子、播磨灘における有害赤潮藻類と微量金属の挙動と分布、平成28年度日本水産学会秋季大会、2016年9月9日、近畿大学（奈良県奈良市）

櫻井康平、内藤佳奈子、今井一郎、赤潮原因プランクトンの増殖における鉄要求性の検討、平成28年度日本水産学会秋季大会、2016年9月9日、近畿大学（奈良県奈良市）

内藤佳奈子、谷口典、坂本節子、紫加田知幸、丸尾雅啓、2015年夏季の豊後水道における有害赤潮藻類と栄養塩および鉄の分布、第18回マリンバイオテクノロジー学会大会、2016年5月29日、北海道大学（北海道函館市）

内藤佳奈子、辻村茂男、丸尾雅啓、今井一郎、淡水植物プランクトンの増殖に及ぼす鉄キレート物質の影響、日本陸水学会第80回大会、2015年9月29日、北海道大学（北海道函館市）

谷口典、宮原一隆、阿部和雄、坂本節子、内藤佳奈子、瀬戸内海における有害赤潮の発生と栄養塩および微量金属の分布、平成27年度瀬戸内海研究フォーラム、2015年9月4日、奈良県文化会館（奈良県奈良市）

内藤佳奈子、大西菜月、坂本節子、阿部和雄、紫加田知幸、山口峰生、2014年夏季の豊後水道における有害赤潮鞭毛藻と栄養塩および溶存鉄の分布、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会、2015年5月31日、東京海洋大学（東京都品川区）  
柴田大志、小林美奈子、夏池真史、吉永郁生、田中克、内藤佳奈子、2013年春季の気仙沼湾における赤潮藻類の増殖ポテンシャル、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会、2015年5月30日、東京海洋大学（東京都品川区）

見谷健志、小杉知佳、加藤敏朗、内藤佳奈子、製鋼スラグ系施肥材溶出液のサイズ分画による微細藻類の増殖に及ぼす影響、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会、2015年5月30日、東京海洋大学（東京都品川区）

内藤佳奈子、大西菜月、紫加田知幸、坂本節子、有害赤潮鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の増殖における鉄利用能の検討、日本藻類学会第39回大会、2015年3月21日、九州大学（福岡県福岡市）

大西菜月、坂本節子、丸尾雅啓、山口峰生、紫加田知幸、内藤佳奈子、豊後水道における有害赤潮鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* と溶存鉄の分布、平成26年度日本水産学会中国・四国支部大会、2014

年11月29日、高知大学（高知県南国市）  
増山悦子、内藤佳奈子、中村健一、河口干潟に生息するスナガニ科の食性及び生息環境比較、日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月11日、東北大学（宮城県仙台市）

坂本節子、内藤佳奈子、阿部和雄、紫加田知幸、山口峰生、愛媛県宇和島湾および北灘における *Karenia mikimotoi* の増殖ポテンシャル、2014年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2014年9月6日、広島大学（広島県東広島市）  
小林美奈子、吉永郁生、田中克、内藤佳奈子、有明海干潟域の藻類増殖ポテンシャル試験による水質評価、2014年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2014年9月6日、広島大学（広島県東広島市）

田淵知奈、坂本節子、増山悦子、中村健一、内藤佳奈子、広島湾における植物プランクトンとアルカリフォスファターゼの鉛直分布および季節変動、2014年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2014年9月5日、広島大学（広島県東広島市）

見谷健志、小杉知佳、加藤敏朗、内藤佳奈子、瀬戸内海の藻場再生に向けた鉄分供給が植物プランクトンの種組成に与える影響、平成26年度瀬戸内海研究フォーラム、2014年8月29日、和歌山県民文化会館（和歌山県和歌山市）

見谷健志、小杉知佳、加藤敏朗、内藤佳奈子、微細藻類の増殖に及ぼす製鋼スラグ系施肥材溶出液の影響、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、2014年5月31日、三重大学（三重県津市）

〔図書〕（計 1件）

内藤佳奈子、恒星社厚生閣、有害有毒プランクトンの科学、2016年、73-81頁。

〔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

内藤 佳奈子 (NAITO, KANAKO)  
県立広島大学・生命環境学部・准教授  
研究者番号：00453217

### (2) 連携研究者

坂本 節子 (SAKAMOTO, SETSUKO)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構  
瀬戸内海区水産研究所・主任研究員  
研究者番号：40265723