

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23448

研究課題名(和文) 渦鞭毛藻赤潮指標の開発と堆積物への応用：赤潮発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of dinoflagellate proxies for revealing mechanism of red-tide formation

研究代表者

安藤 卓人 (Ando, Takuto)

島根大学・学術研究院環境システム科学系・特任助教

研究者番号：30852165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻による赤潮の発生メカニズムをより正確に評価するために、過去の赤潮発生履歴を推定する指標の開発・検討を行なった。特にKarenia属が特有に合成するステロイド(brevesterol)とAlexandrium属が形成するシストの高分子に注目した。Karenia属が合成するbrevesterolは、培養試料からは検出されたものの、堆積物中では検出限界以下であり、水中や表層堆積物中で分解されやすいことが分かった。一方、Alexandrium属シストの高分子の分光分析(赤外・ラマン)をした結果、堆積物中の分解に比較的弱いセルロースを基本骨格とする特殊な分枝状多糖で構成されていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の急激な気候変動に対する生態系の応答を理解する上で、水産学的被害の大きい沿岸域の赤潮発生は注目されている。本研究では、国内で赤潮を発生しているKarenia属とAlexandrium属が特殊に合成する有機物について検討を行なった。また、これらの成分が過去の記録を保持している堆積物や地層から検出されるか検討した。結果として、どちらの成分も分解に弱く、有機物の分解が進んだ堆積物や岩石中には保存されにくいことがわかった。しかし、過去数十年の人新世に焦点をあてた研究では、Alexandrium属のシストとその高分子を利用した指標の利用が可能であり、赤潮発生頻度の評価に今後有用と考える。

研究成果の概要(英文)：Reconstruction of red-tide in the past from paleoclimate archives like sediment cores can reveal the relationship between red-tide and climate change in detail. We focused on red-tide by dinoflagellate, especially genera Karenia and Alexandrium which biosynthesize brevesterol and characteristic transparent cyst, respectively. Brevesterols were detected from culture samples but not from surface sediments. This result suggests brevesterol easily decomposed in water column and/or surface sediment during deposition. From ATR-FTIR and Raman spectroscopic analyses, we concluded the macromolecule of cyst wall of Alexandrium catenella/pacificum is composed of branched  $\beta$ -glucan with fundamental skeleton as cellulose. This macromolecule make soft and sticky properties for the cyst of A. catenella/pacificum, but is more labile than those of other dinocysts. To be used for red-tide reconstruction, further research is needed to understand the early diagenesis of these two proxies.

研究分野：生物地球化学

キーワード：赤潮 渦鞭毛藻 シスト バイオマーカー 赤外分光 ラマン分光 生体高分子 ステロイド

## 1. 研究開始当初の背景

現在の沿岸域で赤潮を起こしている渦鞭毛藻は、ステロイドの一種「ジノステロイド (dinosteroid)」を生合成することが知られており、その特徴的な分子骨格から、堆積物(岩)中における生物指標(バイオマーカー)として用いられてきた(e.g., Ando et al., 2017)。さらに、渦鞭毛藻のうち、有毒赤潮種の *Karenia* 属は、より特殊な分子骨格をもつ「brevesterol」を合成し、バイオマーカーとしての有用性が期待される(Giner et al., 2003)。一方、渦鞭毛藻の多くの種はシストを形成する。シストは主に抵抗性の有機高分子で構成されており、堆積物(岩)中にも保存されている。最近になって、渦鞭毛藻シストの高分子構造が分類学的に利用できる可能性が指摘されてきた(Bogus et al., 2014)。

ところで、近年の急激な温暖化に呼応した渦鞭毛藻赤潮の増加・北上が指摘されている(Wells et al., 2016)。2018年夏には、アメリカ・フロリダ州において過去10年で最大規模の *Karenia* 属による赤潮が発生し、海洋生物の大量死滅を引き起こしているばかりでなく、毒素 brevetoxin はエアロゾルとして飛翔し、人体や陸上生態系にも影響を与えた(e.g., Weisberg et al., 2019)。このように、有毒赤潮種は生態系へ甚大な影響を与えている。環境変動に呼応した渦鞭毛藻赤潮種の応答、すなわち「赤潮の発生メカニズム」を理解することは急務であり、将来の沿岸域における生態系の変化を予測する上でも重要といえる。堆積物試料を用いると、赤潮記録のない時代の沿岸域における渦鞭毛藻赤潮の発生頻度を復元することができる。より長いタイムスケールでの応答を理解することで、発生メカニズムを深く理解することが可能となり、赤潮の将来予測の精度向上につながる。

## 2. 研究の目的

本研究では、過去の沿岸域における赤潮の履歴を復元するために、*Karenia* 属ステロイド指標と *Alexandrium* 属シスト高分子指標の開発と堆積物への応用を行なった。*Karenia* 属、*Alexandrium* 属はともに有毒赤潮渦鞭毛藻であり、沿岸生態系変化の将来予測をする上で、赤潮発生メカニズムと生態系に与える影響を正確に評価する必要がある。

これまで、過去の渦鞭毛藻赤潮を復元するためには、渦鞭毛藻シスト組成を用いた研究が多くなされてきた(e.g., Mudie et al., 2002)。しかし、シスト組成から群集変化を理解することができるものの、全体のバイオマスまで把握するのは難しい。本研究では、

いままですら検討例の少ない特殊なステロイドやシストの高分子構造を用いた新しい指標の開発を目指した(図. 1)。

ステロイドは真核生

物全般が生合成できるため、全ステロイド中の brevesterol の割合を指標化することで、海洋生産者の中における *Karenia* 属のバイオマス量を推定できる。また、*Alexandrium* 属シストは単純楕円形で形態的な特徴に乏しいため、埋没過程で破片化した場合には、他の有機物片と区別が付きにくく、シスト組成から寄与率をした場合に過小評価している可能性がある。*Alexandrium* 属シストから特徴的な高分子構造が発見されれば、破片となったシストも含めた計量が可能となり、有機物のバルク分析からも有機物中の *Alexandrium* 属シストの寄与率を見積もることができる。

加えて、指標と分析手法の開発には、国際連携や国内における新たな学問分野である「Palynology (有機質微化石の化学)」の創成を必要とする。また、これらの指標を用いて観測記録のない過去の温暖期における沿岸域の渦鞭毛藻赤潮履歴を復元した例はこれまでにない。

## 3. 研究の方法

*Karenia* 属の培養試料の GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析器)を用いたステロイド分析、*Alexandrium* 属のシストの micro-FTIR (顕微フーリエ変換赤外分光装置)、micro-Raman (顕微ラマン分光装置)と熱分解 GC-MS による高分子分析を行なった。

*Karenia* 属の培養試料は長崎県総合水産試験場の山砥稔文氏から入手し、申請者がすでに所有している試料を主に用いた。また、瀬戸内海、島根県・中海、長崎県・伊万里湾の堆積物を GC-MS 分析し、堆積物中における brevesterol の検出を目指した。GC-MS の分析は、北海道大学・沢田 健准教授の研究室で行なった。

*Alexandrium* 属のシストを含む大阪湾や大船渡湾の試料は、長崎大学・松岡 数充名誉教授から提供いただいた。これらのシストを含むパリノモルフ(有機質微化石)をピックアップするために、倒立顕微鏡、マイクロインジェクター、マニピレータなど機器の購入・設置をした。micro-

◎ 有毒赤潮種のうち、以下の2属の指標を開発

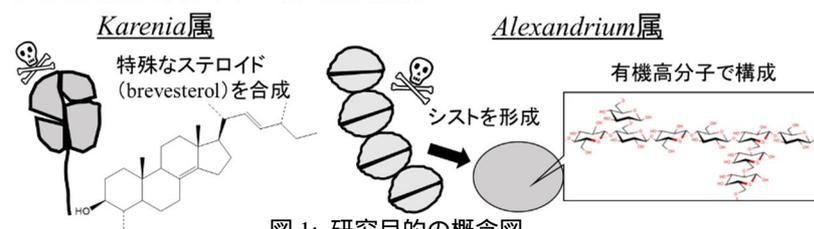


図.1: 研究目的の概念図

FTIR 分析は、ATR (全反射測定) 用結晶が付属した装置を用いた。ATR 法は非破壊でなくなってしまうものの、結晶に設置した極表面のみ測定できると同時に原形質を押し出すことが可能であるため、*Alexandrium* 属のシスト分析には最適であった。令和元年度はドイツ・Bremen 大学 MARUM で手法の発案者である Versteegh 博士の指導のもとで申請者が行なった。令和 2 年度はドイツ・ブレーメン大での研究はできず、島根県産業技術センターで行なった。一方、micro-Raman の分析は島根大学 医・生物ラマンプロジェクトセンターで行なった。

以上の分研究結果から、クラスター分析などの統計学的な解析手法を用いて *Karenia* 属のバイオマーカーである brevesterol を用いた新指標、*Alexandrium* 属のシストの高分子組成を用いた新指標の開発・検討を行なった。

#### 4. 研究成果

*Karenia* 属が生合成するステロイド「brevesterol」については、*Karenia mikimotoi* の培養株では全ステロイド中でもっと多く検出された。その一方で、*Karenia* 属赤潮の発生が報告されている伊万里湾の試料中では、検出限界以下であった。赤潮は短期的なものであるため、数年の記録が保存されるような表層 (1~2cm) 堆積物中では、希釈されて相対的に濃度が低くなる可能性がある。また、brevesterol は B 環の特殊な位置に二重結合があるので、水中や堆積物表層において即時に微生物分解もしくは酸化分解された可能性も高い。

*Alexandrium* 属のシストの高分子構造については、*A. catenella/pacificum* のシストに関して、世界ではじめて高分子分析を行ない、他の渦鞭毛藻シストとは異なる構造であった。*A. catenella/pacificum* は、一般的に楕円形のシストを形成することが知られているが、培養実験下にお

いては様々な形態をとる。実際に、大阪湾堆積物中からは、形態が類似した無色の楕円形~球形もしくは卵型のパリノモルフ (有機質微化石) が多く観察された。高分子構造分析の結果、*A. catenella/pacificum* 特有の赤外スペクトルデータを得ることができた (図.2)。一方で、micro-Raman による分析は、従来のレーザー (532nm など) では自家蛍光を発するため分析が困難であったが、より高波長の 785nm レーザーを用いることで、論文等に報告されている限り世界で初めて渦鞭毛藻シストのラマン分光分析に成功した。

スペクトルの類似度を指標化することで、有毒赤潮渦鞭毛藻シストの判別に役立つことが期待される一方で、形態的特徴によって分けられたグループをまたいで同様な高分子構造していることがわかった。このことは、形態的特徴からでは有毒赤潮渦鞭毛藻シストの判別が難しいことを示しているかもしれない。技術面では、ドイツ・ブレーメン大で micro-FTIR による分析 (北極域研究推進プロジェクト (ArCS) 若手派遣事業: 10 月 6 日~11 月 3 日) を行なうことで、パリノモルフのピッキング法を習得し、帰国後により効率の良いピッキングシステムを考案、本研究費を用いてそれらを研究室に設置することができた。

スペクトル解析については、研究協力者の Zonneveld 教授、Versteegh 博士の両名と議論を行なった。当初、原形質の除去が上手く行なえずシスト壁の高分子測定は上手くいかなかったが、結果的に原形質由来のコンタミネーションについて検討でき、先行研究におけるスペクトルの解釈における問題点を指摘できた。赤外スペクトルの解釈には複数の多糖標準試薬も利用した。これらの試薬と形態の全く異なる渦鞭毛藻シストや他のパリノモルフを外群として加え、*A. catenella/pacificum* シストの高分子構造の特異性を評価したところ、*A. catenella/pacificum* シストは  $\beta$ -1,4-glucan すなわちセルロースを基本骨格とし、そこに  $\beta$ -1,6-結合で分枝状に糖鎖が連なることで柔軟で立体的な構造をしていることがわかり、その非結晶性と柔軟さのために他のシストより分解が早い可能性を新たに指摘した。これらの特殊な高分子構造から、分解が進んでいない表層付近の堆積物試料のみではあるが、シストや有機物をバルクで分析した際に *Alexandrium* シストの割合を簡便に測定もしくはセルソーターなどにより分画できる手法を今後開発できるであろう。

*Alexandrium* 属シストは他のシストと比べて乾燥に弱く、分解が進みやすい易分解性の高分子から構成されていることが分かった。また、上述の *Karenia* 属が特有に生合成する brevesterol についても、他のステロイドと比べて保存性が良くないことが明らかになった。これらのことを踏まえ、堆積岩への応用のために行なう予定であった熱熟成シミュレーションについては断念し、より低温での変化や酸化分解、脱水反応の影響評価をするような「初期続成段階」に注目した研究を試みたが、十分な成果が得られなかった。有機物の初期続成を評価するには、酸化層を含む極表層泥や水中のステロイドやシストやその高分子の組成のみではなく、環境 DNA や微化石などの他の指標との比較が必要と考え、さらなる研究を続けている。

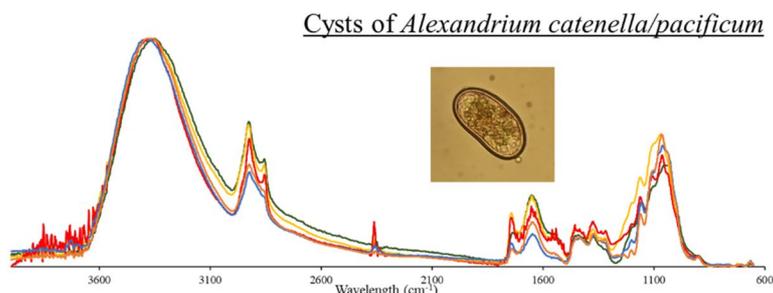


図.2: *Alexandrium catenella/pacificum* シスト壁の赤外スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 安藤卓人, 沢田健, 松岡數充
2. 発表標題 海生パリーノモルフの高分子組成を用いた新規指標の開発に向けて
3. 学会等名 第5回地球環境史学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuto Ando, Kazumi Matsuoka, Karin Zonneveld, Gerard Versteegh
2. 発表標題 Development of new proxies using macromolecular structures of marine palynomorphs
3. 学会等名 JpGU-AGU joint meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuto Ando, Ken Sawada
2. 発表標題 Enhanced dinoflagellate productivity by ocean stratification and eutrophication in the Anthropocene, Miocene, and Cretaceous.
3. 学会等名 JpGU-AGU joint meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuto Ando, Tatsuyuki Yamamoto, Mika Ishigaki, Kazumi Matsuoka
2. 発表標題 Macromolecular analysis of aquatic palynomorphs using micro-Raman spectroscopy
3. 学会等名 JpGU meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuto Ando, Kazumi Matsuoka, Karin Zonneveld, Gerard Versteegh
2. 発表標題 Difference between labile and resistant macromolecules in gonyaulacoid dinocysts
3. 学会等名 The Micropaleontology Society: Microfossil Geochemistry Workshop (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ホームページ <a href="https://takuto-ando-s-web-site.webnode.jp/">https://takuto-ando-s-web-site.webnode.jp/</a> 研究室ホームページ <a href="https://laboratory-of-palynology-and-marine-palynology.webnode.jp/">https://laboratory-of-palynology-and-marine-palynology.webnode.jp/</a>
---

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		
ドイツ	MARUM, Bremen University		