

令和元年6月24日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07508

研究課題名(和文)沿岸域におけるSkeletonema属珪藻の群集構造解析

研究課題名(英文)Community structure of genus Skeletonema in coastal waters

研究代表者

片野 俊也 (Katano, Toshiya)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：00509820

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)：Skeletonema属10種について定量PCRとマルチプレックスPCRのためのプライマーセットを開発した。これらを用いて、種組成の解析を進めた。その結果、有明海、東京湾ともに、淡水産種*S. potamos*を含む6種以上のSkeletonema属が検出された。流入河川感潮域底泥には多くのSkeletonema属が存在していて、大雨による出水後には底泥がSkeletonema属による赤潮のタネ場として機能する可能性が示唆された。冬季に出現する*S. japonicum*と*S. marinoi-dohrnii* complexの競争は環境条件でなく、殻径によって勝者が替わりうることを実験的に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻Skeletonema属は、世界中の多くの内湾に出現し、とりわけ富栄養な水域で優占することが知られている。東京湾とアメリカのナラガンセット湾ではどちらも植物プランクトンの90%以上が、Skeletonemaとされる。2005、2007年のSarnoらの発表により*S. costatum*は、8種にも分類された。この新しい分類体系に基づく種同定は、単離と単離株の種同定に依存し多大な労力と時間を要していたが、本研究で開発されたプライマーセットにより迅速な種判別および定量解析が可能になった。世界の内湾で季節を問わず赤潮を起こすSkeletonemaの動態について今後大きく研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Primer sets against 10 Skeletonema species for Real time PCR and multiplex PCR were developed. Species composition of Skeletonema in Tokyo Bay and the Ariake Sea was evaluated using these PCR techniques. In both bays, more than 6 species of Skeletonema including freshwater species of *S. potamos* were detected. Especially in the bottom sediment of the rivers inflowing to the bays, we detected high abundance and many species of Skeletonema were detected. These results imply that bottom sediments of these rivers possibly play important role as the seed bank of Skeletonema bloom in estuaries. In the competition between winter dominant species of *S. japonicum* and *S. marinoi-dohrnii* complex, in addition to environmental factors, endogenous factor (valve diameter) strongly affects on the results of the competition.

研究分野：水界生態学

キーワード：珪藻赤潮 Skeletonema 競争 群集組成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Skeletonema 属は、世界中の沿岸、内湾に普遍的に存在する珪藻であり、基礎生産者として重要である。反面、しばしば赤潮をおこし、例えばノリ養殖に甚大な被害を及ぼすこともある。かつては、この属の多くは *Skeletonema costatum* と認識(同定)されていたが、その現存量は季節を問わず高密度化すること、汽水域にも分布する広塩性種として記述されていることから、増殖好適環境条件が不明で、そのブルーム発達と終焉のプロセスは、不明であった。

2005-2007年に Sarno らは、rDNA 配列と電子顕微鏡による外部形態を元に *Skeletonema costatum* を 8 種に再分類した(Sarno et al. 2005, 2007)。そのため、*Skeletonema* 属の種数は、従来から記載されていた 5 種に 7 種を加えて(5 種のうち 1 種が 8 種に分かれた) 12 種となった。先行研究(基盤研究C、課題番号 21580222、東京海洋大学 石丸隆教授 代表)によって、東京湾においては 4 種の *Skeletonema* 属が存在することが明らかになっている。また、他の内湾においても複数種の生息が知られている(Yamada et al. 2010, 2013, 2014)。従って、季節を問わずおきている *Skeletonema* 属による赤潮は、季節に応じて別種が赤潮を起こしている可能性がある。

これまでに、*Skeletonema* 属の多くの種について、増殖好適環境が調べられており、種毎に増殖に適さない環境条件に違いが認められている(Kaeriyama et al. 2011, Balzano et al. 2011)。先の石丸らの先行研究では、SEM 試料から東京湾における *Skeletonema* 属の種遷移を調べた。ただし、電子顕微鏡法でも糸状コロニーの末端細胞に主要な分類形質が存在するため、特に細胞形態の保存状態が良くない場合にはコロニーが途中で折れてしまうなどして壊れた中間細胞と末端細胞の区別が難しく、種同定が出来たとしても、定量的な解析が困難である。そのため、*Skeletonema* 属各種の分布域や季節的出現状況などは、ほぼ未解明な状態にある。

この状況を打破するために、分子生物学的手法を活用した種同定プロトコルの確立が望まれる。ところが、現在まで、世界中で *Skeletonema* 属の rDNA の部分配列情報は蓄積してきているにも拘わらず、種特異的 PCR プライマーや FISH プロブの設計は困難を極めていた。その主たる理由としては、1)古いデータはもとより近年データベースに収載された配列情報にも誤同定された株の情報が含まれていたこと、および 2) 収載されていた配列情報の多くが 28S rDNA の D1 から D3 領域が中心であるが、その範囲では、種特異的なプライマーやプロブの設計のための情報が不足していること、が挙げられた。

申請者は、福岡女子大の山田真知子教授と共同で多くの内湾から *Skeletonema* 属珪藻を分離し、形態に基づく種同定を行った上で rDNA 遺伝子の部分配列について D3 領域以降の 28SrDNA の全領域のシーケンシングを進めてきた。その結果、D8 領域に、プライマー、プロブ設計に耐えうる種間変異があることを見出した。

2. 研究の目的

沿岸海域の主要な基礎生産者である珪藻 *Skeletonema* 属珪藻について、通常の PCR 法、マルチプレックス PCR 法による種判別方法の確立および、リアルタイム PCR 法により種毎の現存量評価を行う手法を確立する。さらに、それらの手法を活用して、

- I. 内湾(主に東京湾)における、各種の季節動態を調べる。また、
- II. 内湾の塩分勾配に従う *Skeletonema* 属珪藻の空間的種遷移、を明らかにする。
- III. 底泥試料を用いて、環境条件を変化させた発芽試験を行う。
- IV. 研究の途上で、東京湾においては冬季に *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex が出現しており、競争関係にあることが予想されたことから、2 者培養による競合についての室内

培養実験を行う。

3. 研究の方法

I. プライマーのデザイン

Skeletonema 属には 12 種が知られているが、このうち *S. marinoi* と *S. dohrnii* については、披殻微細構造に違いがないこと、LSU rDNA の配列でも違いが少なく、例えば 785 塩基中 3 塩基しか違いがないこと、LSU rDNA では *S. dohrnii* と同定されるが、SSU rDNA では *S. marinoi* と同定される株が存在することのため、*S. marinoi* と *S. dohrnii* は、LSU rDNA および SEM を用いた披殻微細構造から区別（同定）が困難であることから、同一種として扱うこととした。また、*S. subsalsum* は、利用できる株がどこにも現存しない。この種についても *S. potamos* と同一種である可能性が指摘されている。従って、本研究では 10 種について種特異的プライマーの開発を進めた。

II. 塩分勾配に従う *Skeletonema* 属珪藻の空間的種遷移についての調査

有明海に注ぐ筑後川と東京湾に注ぐ荒川で観測を行った。どちらの観測においても、河川感潮域に 2-3 点の観測点を設け、泥を採取し、PCR により、筑後川では通常の PCR による種判別にて、出現種解析を行い、荒川では、リアルタイム PCR により出現種毎の定量解析を行った。

III. 底泥試料を用いて、環境条件を変化させた発芽試験

東京湾から採取した泥を用いて、発芽試験を行った。培養条件は、塩分 5 と 30、水温 5 度 15 度 25 度の組み合わせで 6 条件で行った。

IV. *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の競争についての室内実験

東京湾から採集・単離した *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の培養株を用いて、2 者による競争に関して培養実験を行った。予備試験として、細胞のサイズを一定に揃えて、各株について、サイズ毎に増殖速度を調べた。次に、2 者の競争の結果に及ぼす、細胞サイズの影響を調べるため、サイズの大きい *S. japonicum* とサイズの小さい *S. marinoi-dohrnii* complex の 2 者培養とサイズの小さい *S. japonicum* とサイズの大きい *S. marinoi-dohrnii* complex の 2 者培養を行い競争の結果を調べた。

4. 研究成果

I. プライマーのデザイン

通常の PCR による種判別用プライマーはリアルタイム PCR 用プライマーと兼用とした。またマルチプレックス PCR 用プライマーセットでは、*S. japonicum*, *S. grethae*, *S. grevillei* については設計が出来なかった。残りの 7 種については、マルチプレックス用の 2 つのプライマーセットで、複数種の同時検出に成功した(Enjoji et al. in press)。

II. 塩分勾配に従う *Skeletonema* 属珪藻の空間的種遷移についての調査

筑後川において、塩分が<1.8 の感潮域上流部においては、検出される *Skeletonema* 属は出現頻度の順に、*S. potamos*, *S. marinoi-dohrnii* complex, *S. ardens* の 3 種であった。一方、海域（塩分は>21）においては、*S. marinoi-dohrnii* complex, *S. menzelii*, *S. grevillei*, *S. potamos*, *S. tropicum*, *S. japonicum*, *S. ardens* の順で 7 種が検出された。このように、塩分の勾配に応じて出現種数が大きくことなり、感潮河道内と海域においては優占種が異なっている事が示唆さ

れた(Enjoji et al. in press)。

荒川および東京湾河口域においては、定量 PCR による種組成解析を行った。その結果、荒川河口域よりも、感潮河道下流部において、*Skeletonema* 細胞密度は 4 倍以上高かった。また、感潮河道内にて *S. ardens*、*S. japonicum*、*S. menzeli*、*S. marinoi-dohrnii* complex などの海産種が多く検出された。これらのことから、荒川感潮河道は、東京湾の *Skeletonema* のタネ場として機能している可能性が考えられた(未発表)。

III. 底泥試料を用いた発芽試験

6 月と 9 月に東京湾から採取した底泥を用いて、*Skeletonema* 属の発芽試験を行ったところ、塩分 5 の条件下では全ての温度条件下で *S. potamos* が発芽した。一方、*S. menzeli* は 25 度塩分 30 で発芽したが 5 度、塩分 5 では発芽しなかった。このように、水温、塩分に応じて発芽種が変わることを見いだした。一方で東京湾の優占種 *S. marinoi-dohrnii* complex は全ての条件で発芽した。今回の試験では定量的解析は行っていないが、泥中に多い種については、発芽に最適な条件でなくても僅かに発芽する細胞を検出していた可能性が考えられた(未発表)。今後、定量的解析により検討する必要がある。

IV. *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の競争

Skeletonema japonicum と *S. marinoi-dohrnii* complex の増殖速度は、同一株においてサイズ回復直後の大きな殻径のものよりも殻径が小さいほど増殖速度が高まり、*S. japonicum* の場合、1.0 から 1.5 day⁻¹ に高まった。殻径が一定以下になり増大胞子が観察されるようになると一転して増殖速度は 0.7 day⁻¹ に低下した。温度 15 度において *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の増殖速度は 0.7–2.1 day⁻¹ の間にあり、両者の増殖速度範囲は重複していた。そこで、*S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の細胞サイズの組み合わせを変えて 2 者の競合試験を行った。その結果、殻径の小さい種がもう一方の種に勝つことが示された。これらの結果は、*Skeletonema* 属の増殖速度は環境条件によって一意に決まらないこと、細胞サイズによって、2 者の競合の勝者が変わってしまうことを示している(Ando and Katano 2018)。

本研究結果のまとめ

Skeletonema 属珪藻 10 種について定量的解析を行うための定量 PCR 用プライマーセットを開発した。同時にマルチプレックス PCR により簡便に種判別できるプライマーセットも開発した。これらの技術を用いて、主に内湾に注ぐ流入河川感潮域と河口域において、水・泥試料を採取して種組成の解析、発芽と環境条件の解析を進めた。その結果、有明海、東京湾ともに、6 種以上の *Skeletonema* 属が検出された。淡水産種 *S. potamos* が海域で頻繁に出現することも見いだした。また、流入河川感潮域底泥には多くの *Skeletonema* 属珪藻が存在していて、大雨などの出水後には *Skeletonema* 属珪藻による赤潮のタネ場として機能している可能性が示唆された。泥からの発芽において、環境条件に応じて発芽種が変わることが分かったが、環境条件が最適ではなくても発芽することも分かった。そのため底泥試料から赤潮原因種を推定する際には、環境条件だけでなく、種毎の存在量も重要な要因であることが考えられる。

一方、冬季に多く出現する *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex については、その 2 者の競争は環境条件だけでなく、サイズ回復からの時間、殻径によって、勝者が替わってしまうことを実験的に示した。従って、赤潮原因種の予測においては、環境条件だけではなく、生活環のどのステージにあるかも考慮する必要があることが分かった。

< 引用文献 >

- Balzano, S., D. Sarno, W. H. C. F. Kooistra 2011. Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten *Skeletonema* strains. *J. Plankton Res.* **33**: 937-945.
- Kaeriyama, H., E. Katsuki, M. Otsubo, M. Yamada, K. Ichimi, K. Tada, P. J. Harrison 2011. Effects of temperature and irradiance on growth of strains belonging to seven *Skeletonema* species isolated from Dokai Bay, southern Japan. *Eur. J. Phycol.* **46**: 113-124.
- Sarno et al. 2005, Sarno, D., W. H. C. F. Kooistra, L. K. Medlin, I. Percopo, A. Zingone 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. Phycol.* **41**: 151-176.
- Sarno et al. 2007 Sarno, D., W. H. C. F. Kooistra, P. E. Hargraves and A. Zingone 2007. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). III. Phylogenetic position and morphology of *Skeletonema costatum* and *Skeletonema grevillei*, with the description of *Skeletonema ardens* sp. nov. *J. Phycol.* **43**: 156-170.
- Yamada, M., E. Katsuki, M. Otsubo, M. Kawaguchi, K. Ichimi, H. Kaeriyama, K. Tada, P. J. Harrison 2010. Species diversity of genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in the industrial harbor Dokai Bay, Japan. *J. Oceanogr.* **66**: 755-771.
- Yamada, M., M. Otsubo, Y. Tsutsumi, C. Mizota, N. Iida, K. Okamura, M. Kodama, A. Umehara 2013. Species diversity of the marine diatom genus *Skeletonema* in Japanese brackish water areas. *Fish. Sci.* **79**: 923-934.
- Yamada, M., M. Otsubo, M. Kodama, K. Yamamoto, T. Nishikawa, K. Ichimi, K. Tada and P. J. Harrison 2014. Species composition of *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in planktonic and resting-stage cells in Osaka and Tokyo Bays. *Plankton Benthos Res.* **9**: 168-175.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Ando, Y. Katano, T. (2018) Effect of cell size on growth rates of two *Skeletonema* species and their competitive interactions. *Journal of Phycology* 54: 850-859.
2. Enjoji, N. Katano, T., Yoshinaka, Y., Furuoka, F., Ando, Y., Yamada, M., Hamasaki, T., Miyamura, E., Otsubo, M., Yokoyama, K., (2019) Development of primer sets for a multiplex and a qPCR assays targeting *Skeletonema* species and its application to field samples. *Journal of Oceanography* DOI: 10.1007/s10872-018-00504-3

〔学会発表〕(計9件)

1. 安東祐太郎、片野俊也 *Skeletonema japonicum*の殻径と増殖速度の関係 日本プランクトン学会 2016年9月10-14日 熊本県立大学
2. 宮村咲香、丸尾愛和、大坪繭子、山田真知子、片野俊也、堀恭子 Real-time PCRを用いた海産珪藻*Skeletonema*属の簡便・安価・定量的同定方法の開発 日本プランクトン学会 2016年9月10-14日 熊本県立大学
3. 円城寺夏実、片野俊也、山田真知子、濱崎智美、大坪繭子、横山勝英、吉野健児 *Skeletonema*属珪藻の種判別とそれを利用した筑後川感潮河道における種組成の調査、日本海洋学会秋季大会 2016年9月14日 鹿児島大学

4. 吉中祐紀、小林あずさ、円城寺夏実、片野俊也 東京湾における*Skeletonema*属珪藻のPCR法による出現種解析、海洋生物学研究会シンポジウム、2017年3月24日 東京海洋大学
5. Katano, T., Enjoji, N., Yoshinaka, Y., Furuoka, F., Ando, Y., Yamada, M., Otsubo, M., Yokoyama, K., Development of multiplex and real-time PCR assays for the detection and quantification of *Skeletonema* species. East-HAB Symposium 12-14 Dec., 2017 Hakodate
6. 片野俊也、円城寺夏実、山田真知子、大坪繭子、中島有紀子、横山勝英、吉野健児 河川感潮域から河口域における底泥堆積物と水柱の*Skeletonema*属珪藻の種組成解析 JpGU2018 日本地球惑星科学連合大会 2018年5月21日、幕張メッセ、千葉
7. 吉中祐紀、片野俊也 東京湾における珪藻 *Skeletonema* 属の PCR 法による出現種解析 日本プランクトン・ベントス合同大会、2018年9月9-11日、創価大学、八王子
8. 古岡鳳夏、片野俊也 東京湾の底泥中における珪藻 *Skeletonema* 属の qPCR による定量解析 日本プランクトン・ベントス合同大会、2018年9月9-11日、創価大学、八王子
9. 安東祐太郎、片野俊也 細胞サイズの減少—回復過程が珪藻の増殖速度と競争の結果に及ぼす影響、日本プランクトン学会 2017年9月9-11日 滋賀県立大学

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田真知子

ローマ字氏名：Machiko Yamada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。