

平成22年 4月10日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19780150
 研究課題名 (和文) 有害渦鞭毛藻コクロディニウムのライボタイプ識別と分布海域

研究課題名 (英文) Ribotype identification and distribution of a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*.

研究代表者
 岩滝 光儀 (MITSUNORI IWATAKI)
 山形大学・理学部・准教授
 研究者番号：50423645

研究成果の概要 (和文)：赤潮原因種 *Cochlodinium polykrikoides* の分布海域を個体群レベルで把握するため、光合成性 *Cochlodinium* の形態比較と rDNA に基づく種内系統群 (ライボタイプ) の識別を行った。形態に違いの見られた本種類似種を *C. fulvescens* として新種記載し、これを識別した上で系統解析した結果、*C. polykrikoides* 種内は東アジア、フィリピン、北中米、の3タイプに識別された。この結果は西日本沿岸に例年出現する本種赤潮は東シナ海周辺海域で越冬していることを示す。

研究成果の概要 (英文)：Morphology and ribotype (genotype based on rDNA) of a harmful red tide forming dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* was examined to reveal distribution of each ribotype. A new species *C. fulvescens* was described based on morphological comparison. A harmful species *C. polykrikoides* was divided into three ribotypes, East Asian, Philippines and American types in the phylogenetic tree. This indicates the red tides occurred in western Japanese coasts were formed by cells overwintering around the East China Sea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海洋生物, 系統進化, 遺伝子, 赤潮, ライボタイプ

1. 研究開始当初の背景

無殻渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* は魚類の大量へい死を引き起こす有害赤潮原因種である。本種は1961年にプエルトリコより記載された後、現在までにカリブ海や東西太平洋を中心に、温帯域から熱帯域にか

けて出現し漁業被害も報告されている。90年代には韓国沿岸域で同種赤潮による被害が顕著化し (Kim 1998), 続いて西日本でも漁業被害が頻発したため、近年では東アジアにおいて最も注目される有害植物プランクトンとなっていた。本種の出現状況に関して、

松岡・岩滝 (2002) は西日本には海流に依存して移動するタイプと、これとは別に散発的に発生するタイプがあることを推察した。また人工衛星画像より、宮原ら (2005) は韓国南岸から日本海を越えて本邦中国地方へ、そして Rhodora et al. (2005) はバラバク海峡を越えてマレーシア・ボルネオ島からフィリピン・パラワン島北岸へ本種赤潮が流れ着く様子を報告している。以上より、本種赤潮は海流に依存して比較的広範囲にわたり移動することが示唆された。

西日本では例年夏季に本種による赤潮と漁業被害が記録されているが、これら本種の細胞は冬季には観察されない。越冬海域を特定することは赤潮形成メカニズムを解明する上で重要であるが、本種赤潮は南方より移動してくる可能性があるため、個体群レベルでの分布海域、すなわち移動範囲を特定した上で初期発生について考察する必要がある。

2. 研究の目的

形態比較からは識別されない有害赤潮種 *C. polykrikoides* の個体群を遺伝子レベルで識別し、それぞれの分布海域を特定することを目的として分子系統解析を行った。個体群識別を目的とした遺伝子種には LSU rDNA を使用したため、これに基づく種内系統群をここではライボタイプと呼ぶ。本研究では、以下の4つを具体的な成果として明らかにすることを目指した。

(1) *C. polykrikoides* の種内系統群を解析するために、形態的に類似する光合成性 *Cochlodinium* を識別する。

(2) 世界に分布する *C. polykrikoides* の種内系統群 (ライボタイプ) を識別する。

(3) それぞれの *C. polykrikoides* ライボタイプの分布範囲を特定する。

(4) 本種の地理的拡散仮定を推定し、この中に含まれる突発的 (人為的) 移動について考察する。

3. 研究の方法

(1) 材料：形態比較と分子系統解析を行うために有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* と形態的類似種を採集し、単藻培養株を作成した。*C. polykrikoides* 類似種の試料は長崎県橘湾沖と上五島より採集した。ライボタイプ識別に用いた *C. polykrikoides* の試料は図1に示す海域より採集した。この試料には、日本産9株の他、韓国産6株、香港産株、フィリピン・マニラ湾産株、マレーシア・サバ州産2株、ニューヨーク産株、マサチューセッツ産株、メキシコ・ラパス湾産株、プエルトリコ産株、カリフォルニア産株、カナダ・ブリティッシュコロンビア産株が含まれる。培養株の作成には ESM 培地を用い、

20°C、恒明条件で継代培養した。

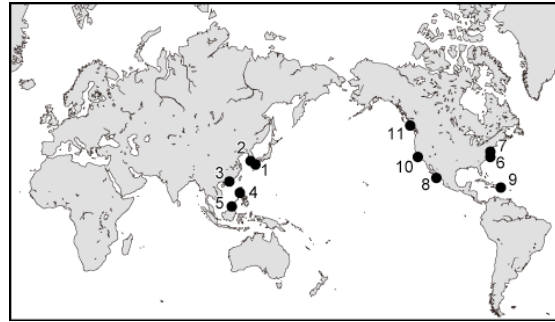


図1 *Cochlodinium polykrikoides* の採集海域

(2) 形態観察：*Cochlodinium* の細胞は微分干渉顕微鏡 (Olympus BX51) で観察し、形態写真はデジタルカメラ (Olympus DP50) で撮影した。葉緑体の形状は青色励起光下で自家蛍光を観察した。

走査電子顕微鏡観察用の細胞試料はオスミウム酸による固定後、エタノール系列で脱水し、臨界点乾燥により作成した。乾燥試料を白金パラジウム蒸着後、走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM6390) で観察した。

(3) 分子系統解析：*C. polykrikoides* の種内系統群 (ライボタイプ) を識別するための遺伝子種には LSU rDNA (D1-D6 region, 約 1500bp) を用いた。DNA 配列の増幅は常法によりサーマルサイクラー (ABI GeneAmp PCR system 9700) を用いて行い、配列の決定には DNA シークエンサー (ABI PRISM 377 sequencer) を用いた。解析した LSU rDNA 配列のマルチプルアライメントを取り、ガンマ補正により重みづけした後に最尤法で系統樹を構築した。系統群それぞれを評価するためのブートストラップ値は近隣結合法、最大節約法、最尤法を用いて求めた。

4. 研究成果

(1) 類似種との識別：有害種 *Cochlodinium polykrikoides* 種内のライボタイプを識別するためには、形態の類似する光合成性 *Cochlodinium* と同種を性格に識別した上で分子系統解析を行う必要がある。類似種の形態比較からは、*C. polykrikoides* 以外に3種の光合成性 *Cochlodinium* を識別された。そのうち一種は既記載種の *Cochlodinium convolutum* で、同種は長い連鎖群体を形成することはなく、横溝は深く細胞を約 1.5 周すること、そして細胞長軸に沿って伸びる断面が長方形の核をもつことにより *C. polykrikoides* と識別できる (Matsuoka et al. 2008)。もう一つの類似種である長崎県橘湾産株は、連鎖群体を形成する、核が球形で細胞上方に位置する、横溝は細胞をおよそ 1.8-2.0 周する、上錐背面に赤色顆粒が見られるなど、*C. polykrikoides* と共通の形態形質をもつ。*C. polykrikoides* と同種の

形態をそれぞれ図2と図3に示す。

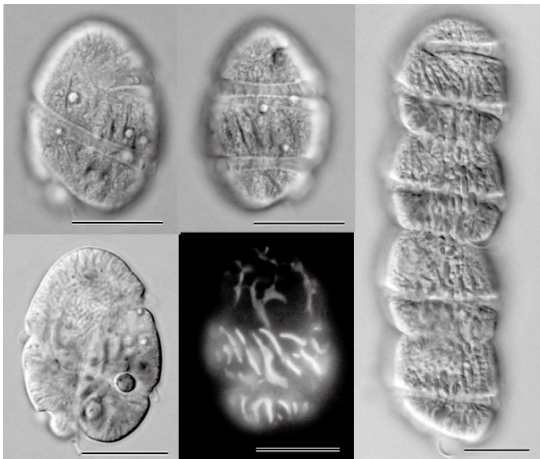


図2 *Cochlodinium polykrikoides* の光学顕微鏡像

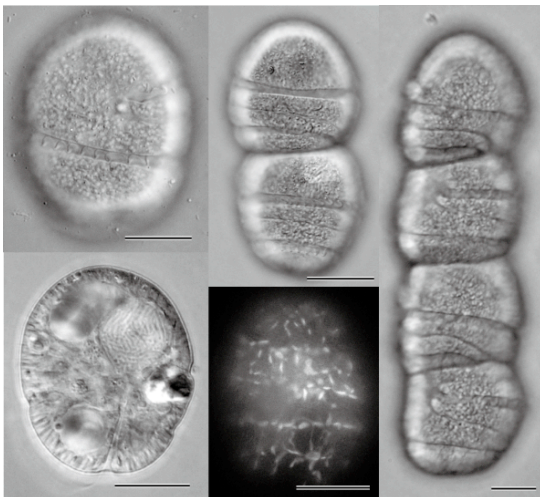


図3 *Cochlodinium fulvescens* の光学顕微鏡像

これら2種は上述した形質を共有するものの、*C. polykrikoides* は16細胞までの長い連鎖群体を形成するのに対し、橘湾産株は4細胞までからなる連鎖群体しか形成しない。また、*C. polykrikoides* の縦溝は横溝直下に位置するのに対し、同株は横溝と横溝の中間付近に位置する、そして前者の葉緑体は棒状で細胞斜め方向に並ぶのに対し後者のそれは棒状でなく顆粒状であるなど、明確に識別できる形質が観察された。また、これら2種は分子系統解析の結果からも、渦鞭毛藻綱内で単系統群を形成するが、塩基配列が明確に識別される姉妹群であることが示された(図4)。

この *Cochlodinium* sp.橘湾産株については *C. polykrikoides* と形態的に識別でき、文献調査より過去にこれらの形質をもつ種は報告されていなかったことから、新種 *Cochlodinium fulvescens* Iwataki, Kawami et Matsuoka として記載報告した(Iwataki et al. 2007)。

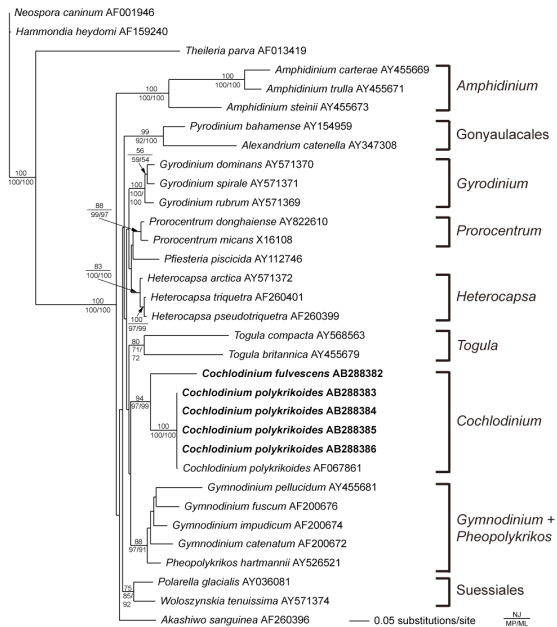


図4 *Cochlodinium polykrikoides* と *C. fulvescens* の系統樹

もう一つの光合成性の *Cochlodinium* は2連鎖までの群体を形成し、横溝の周囲が細胞外へ突出した特徴的な輪郭が見られる。系統解析の結果、この種は *C. polykrikoides* の系統群とは類縁を示さず、狭義の *Gymnodinium* の系統群に含まれた。この種については現在記載報告の準備中である。

(2) *C. polykrikoides* 種内のライボタイプ識別: LSU rDNA に基づく *C. polykrikoides* 種内の分子系統解析をアジア産株に北中米産株を加えて行った。これら解析した培養株の中で、北米太平洋岸のカナダ・ブリティッシュコロンビア産株とアメリカ・カリフォルニア産株は *C. polykrikoides* ではなく、新種として記載した *C. fulvescens* に近縁であることが分かった。*C. polykrikoides* 種内は3つのライボタイプ、1) 東アジアタイプ(日本産8株・韓国産6株・香港産株を含む)、2) フィリピンタイプ(マニラ湾産株と大村湾産株を含む)、3) 北中米タイプ(マレーシア・サバ産2株、北米大西洋岸、メキシコ太平洋岸株を含む)に識別された(図5)。アジア産株について見ると、ライボタイプでは日本産株のほとんどは韓国産株と同じタイプに含まれ、これらは東南アジアのフィリピンやマレーシアに分布する本種とはライボタイプが異なる。このことは、例年日本や韓国に出現する本種赤潮は東南アジアなど南方海域より流れ着くものではなく、東シナ海周辺海域で越冬していることを示す。したがって、西日本で赤潮を形成している *C. polykrikoides* の細胞は、西日本周辺海域で探索する必要がある。香港産株も同じライボタイプに含まれたが、本種赤潮は香港で毎年確認されていない。

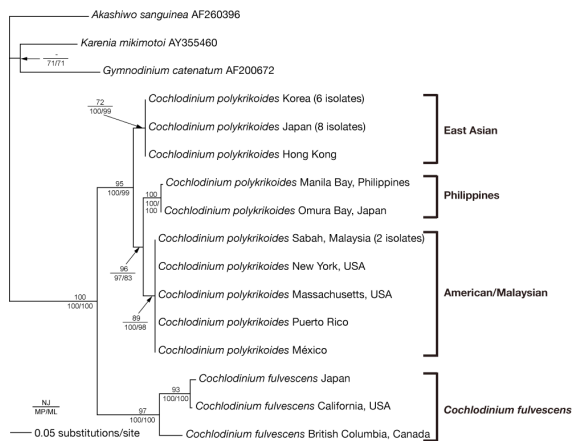


図5 *Cochlodinium polykrikoides* の種内系統群

今回行った分子系統解析により東南アジア、東アジアで少なくとも3つのライボタイプに識別された *C. polykrikoides* は、北米太平洋岸、大西洋岸、カリブ海産株が全て同じライボタイプに含まれた。このライボタイプ形成後、北中米に分布域が広がった可能性がある。さらに、マレーシア・サバ産の2株がこの北中米のライボタイプに含まれたことは興味深い。マレーシアでは2000年代に入ってから本種赤潮の出現が確認されているため、近年北中米より移動した可能性があるが、この移動の方向や方法、時期については今回の解析からは明らかにできない。

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7件)

1. 松岡数充・岩滝光儀 2009. 有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* と類似種の分類と分布. 日本プランクトン学会報 56 (1): 27-30. 査読あり
2. 大原治・岩滝光儀・田中昭彦・石坂丞二・山砥稔文・松岡数充 2008. 長崎県形上湾の植物プランクトン種組成と赤潮形成種の増殖環境 (2004-2006). 日本プランクトン学会報 55 (2): 93-106. 査読あり
3. K.-Y. Kim, M. Iwataki and C.-H. Kim 2008. Molecular phylogenetic affiliation of *Dissodinium pseudolunula*, *Pheopolykrikos hartmannii*, *Polykrikos* cf. *schwartzii* and *Polykrikos kofoidii* to *Gymnodinium* sensu stricto species (Dinophyceae). Phycological Research 56 (2): 89-92. 査読あり
4. M. Iwataki, H. Kawami, K. Mizushima, C. M. Mikulski, G. J. Doucette, J. R. Relox. Jr., A. Anton, Y. Fukuyo and K. Matsuoka 2008. Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*

(Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. Harmful Algae 7 (3): 271-277. 査読あり

5. K. Matsuoka, M. Iwataki and H. Kawami 2008. Morphology and taxonomy of chain forming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae). Harmful Algae 7 (3): 261-270. 査読あり
6. M. Iwataki, H. Kawami and K. Matsuoka 2007. *Cochlodinium fulvescens* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new chain-forming unarmored dinoflagellate from Asian coasts. Phycological Research 55 (3): 231-239. 査読あり
7. 岩滝光儀・松岡数充 2007. 有害渦鞭毛藻類の分布域と導入. 日本プランクトン学会報 54 (1): 24-27. 査読あり

[学会発表] (計24件)

1. 岩滝光儀・G. Hansen・Ø. Moestrup, 無殻渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* の微細構造. 日本藻類学会第34回大会, 筑波大学, 2010年3月20日.
2. M. Iwataki, G. Hansen, Ø. Moestrup and K. Matsuoka, Ultrastructure of a Harmful Unarmored Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) with Reference to the Apical Groove and Flagellar Apparatus. The 4th JSPS-VAST Joint Seminar "Coastal Marine Science", Hai Phong, Vietnam, 26 Oct. 2009.
3. K. Matsuoka, A. Mizuno, M. Iwataki, Y. Takano, T. Yamatogi, Y.-H. Yoon and J.-B. Lee, Occurrence pattern and seed populations of a harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in the East China Sea. The 4th JSPS-VAST Joint Seminar "Coastal Marine Science", Hai Phong, Vietnam, 26 Oct. 2009.
4. K. Matsuoka, A. Mizuno, M. Iwataki, Y. Takano, T. Yamatogi, Y.H. Yoon, D.Y. Lee, J. B. Lee and H.S. Kim, Seed populations of a harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef in the East China Sea. Workshop on Marine Environment in the East China Sea and Its Sound Future, Fukuoka, 5 Dec. 2008.
5. M. Iwataki and K. Matsuoka, Taxonomy and phylogeny of *Cochlodinium polykrikoides* and related species occurred in the East China Sea. Workshop on Marine Environment in the East China Sea and Its Sound Future, Fukuoka, 5 Dec. 2008.
6. K. Matsuoka, A. Mizuno, M. Iwataki, Y. Takano, T. Yamatogi, H. Kawami, Y.-H. Yoon, D.-Y. Lee, J.-B. Lee and H.-S. Kim, Seasonal occurrence of a harmful

- unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef in the East China Sea. The International Conference on Harmful Algae (HAB2008), Hong Kong, 4 Nov. 2008.
7. M. Iwataki, H. Kawami, Y. Takano, S. P. Law, S. Lu, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, Morphology and phylogenetic position of an unarmored dinoflagellate forming brownish resting cyst. The International Conference on Harmful Algae (HAB2008), Hong Kong, 4 Nov. 2008.
 8. K. Matsuoka, M. Iwataki and Y. Takano, Morphological variation of resting cysts in some "*Cochlodinium* species". 5th International Symposium on Targeted HAB species in the East Asia Waters (EASTHAB 5), Hangzhou, China, Nov. 2008.
 9. 岩滝光儀・大原治・山砥稔文・高橋鉄哉・中田英昭・松岡數充, 大村湾に出現する有害植物プランクトンと出現環境. 平成20年日本水産学会九州支部例会(シンポジウム)「九州沿岸域における漁場環境保全の現状と展望」, 長崎大学水産学部, 2008年9月27日.
 10. 高野義人・岩滝光儀・水野あかね・山砥稔文・坂本節子・山口峰生・松岡數充, 有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* の分子系統学的解析と形態比較. 2008年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 熊本県立大学, 2008年9月5日.
 11. 松岡數充・水野あかね・山砥稔文・Joon-Baek Lee・Yang-Ho Yoon・高野義人・岩滝光儀, 東シナ海北部における有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* の出現状況. 2008年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 熊本県立大学, 2008年9月5日.
 12. 松岡數充・岩滝光儀, 有害赤潮プランクトンの輸送と分散-コクロディニウムを例として-. RIAM フォーラム 2008, 九州大学, 2008年6月.
 13. M. Iwataki, H. Kawami, Y. Takano, S.P.C. Law, S. Lu, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, Morphology and phylogenetic position of a *Cochlodinium*-like unarmored dinoflagellate forming resting cyst. IOC/WESTPAC 7th International Scientific Symposium, Kota Kinabalu, Malaysia, 23 May 2008.
 14. M. Iwataki, H. Kawami, Y. Takano, S.P.C. Law, S. Lu, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, Morphology and phylogeny of a *Cochlodinium*-like unarmored dinoflagellate with reference to its cyst-motile cell relationship. DINO8, Montreal, Canada, 6 May 2008.
 15. 松岡數充・岩滝光儀, 有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* と類似種の分類と分布. 2008年プランクトン学会春季シンポジウム, 東京海洋大学, 2008年3月26日.
 16. 松岡數充・水野あかね・川見寿枝・高野義人・岩滝光儀・Y. H. Yoon・J.-B. Lee, 東シナ海周辺海域における有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* の出現時期(2006-2007). 日本藻類学会第32回大会, 東京海洋大学海洋科学部, 2008年3月22日.
 17. 岩滝光儀・川見寿枝・高野義人・松岡數充, 長崎五島産 *Cochlodinium* 様無殻渦鞭毛藻1種の形態と系統. 日本藻類学会第32回大会, 東京海洋大学海洋科学部, 2008年3月22日.
 18. M. Iwataki, H. Kawami, C. M. Mikulski, G. J. Doucette, J. R. Relox Jr., A. Anton, K. Matsuoka, Phylogenetic relationship and distribution of two noxious dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* and *C. fulvescens* (Gymnodiniales, Dinophyceae). Asian-GEOHAB, National Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam, 30 Jan 2008.
 19. Y. Takano, M. Iwataki, A. Mizuno, H. Kawami, K. Mizushima, S. Sakamoto, M. Yamaguchi, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, Molecular phylogeny and comparative morphology of a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae). 4th International symposium on targeted HAB species in the East Asia Waters (EASTHAB4), Changwon, Korea, 7 Dec 2007.
 20. M. Iwataki, Morphology and phylogeny of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) with the occurrence in the East China Sea. 2nd Workshop on Marine Science between NTNU and NU, Nagasaki, 14 Nov 2007.
 21. Y. Takano, M. Iwataki, A. Mizuno, H. Kawami, K. Mizushima, S. Sakamoto, M. Yamaguchi, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, A molecular phylogenetic and morphological study of a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae). The 6th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Nagasaki, 4 Nov 2007.
 22. M. Iwataki, H. Kawami and K. Matsuoka, Morphological comparison and harmful effects of photosynthetic *Cochlodinium* species (Gymnodiniales, Dinophyceae). The 6th International Workshop on the

Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Nagasaki, 4 Nov 2007.

23. 水野あかね・川見寿枝・山砥稔文・高野義人・岩滝光儀・松岡數充, 西九州沿岸及び沖合における有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* の出現状況 (2006年4月~2007年6月). 2007年日本ベントス・日本プランクトン学会合同大会, 横浜市立大学, 2007年9月22日.
24. M. Iwataki, H. Kawami, J. R. Relox Jr., A. Anton, Y. Fukuyo, K. Matsuoka, Phylogenetic relationship in a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* occurred in the East and Southeast Asian coastal waters. LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, Inna Garuda Hotel, Yogyakarta, Indonesia, 4 Aug 2007.

〔図書〕 (計1件)

1. 岩滝光儀・松岡數充 2009. 移動する有害渦鞭毛藻類. In 海の外来生物：人間によって攪乱された地球の海. 東海大学出版会. pp. 107-119.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩滝 光儀 (MITSUNORI IWATAKI)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：5 0 4 2 3 6 4 5