

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06211

研究課題名（和文）好低温性赤潮藻のシスト発芽能評価に基づく赤潮発生予察技術の開発

研究課題名（英文）Development of a red tide-predicting method based on potential for resting cyst germination of a psychrotrophic red tide-causing microalga

研究代表者

吉川 毅（YOSHIKAWA, Takeshi）

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授

研究者番号：10295280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：ディクチオカ藻 *Pseudochattonella verruculosa* は、高緯度海域や冬季などの低温環境でも赤潮を形成し漁業被害をもたらしている。本研究では、本藻の葉緑体ゲノムDNAについて部分塩基配列を決定した。本ゲノムDNAを標的とした定量PCRを行い、天然環境中の本藻を特異的に検出・定量化する手法を確立した。また、光合成関連遺伝子の逆転写定量PCRおよび網羅的トランスクリプトーム解析により、生活環各段階での遺伝子発現パターンを比較した。その結果、休眠期と推察される細胞集塊形成期には基本的な代謝機能が抑制される一方、分子シャペロンや光合成関連遺伝子の発現は促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P. verruculosa は、サケ養殖などが盛んな海外の養殖漁場で甚大な赤潮被害をもたらしているほか、近年我が国でもブルームの形成、それに伴う漁業被害が報告されるようになった。しかしながら、その生理生態や生活環など不明な点が多い。本研究では、遺伝子レベルでの本藻特異的な検出・定量化法を確立し、生活環各段階に特有の遺伝子発現パターンを明らかにした。これらの知見は、細胞レベル、遺伝子レベルでの生活環や生理生態の解明に繋がる。さらには、赤潮予測技術の開発やシード・ポピュレーションとして機能する休眠期細胞の制御による赤潮防除法の確立にも資すると期待される。

研究成果の概要（英文）：A psychrotrophic dictyochophyte *Pseudochattonella verruculosa* is known as a causative agent of red tides in high latitude or winter marine waters. In this study, a method was developed to specifically quantify the microalga with a quantitative PCR (qPCR) targeting the plastid genome DNA after determining its partial nucleotide sequences. Then, comprehensive transcriptome analyses as well as photosynthesis-related gene-targeting qPCR were done to clarify gene expression profiles at different stages in the microalgal cell cycle. The results showed that basal metabolic activities were reduced at a possibly resting, cell aggregate-forming stage, while expression of molecular chaperon- and photosynthesis-related genes were induced. These findings will contribute to developing a method to predict red tides at an initial stage of their outbreaks as well as to prevent microalgal blooming by controlling production and release of unicellular, swimming vegetative cells from the cell aggregates.

研究分野：水圏環境微生物学

キーワード：好低温性赤潮 生活環 休眠期 定量PCR トランスクリプトーム 遺伝子発現 赤潮予測

1. 研究開始当初の背景

赤潮原因藻類の一種、ディクチオカ藻 *Pseudochattonella verruculosa* は、北欧や南米のサケ類養殖漁場で大規模な赤潮を形成し、甚大な漁業被害をもたらしている (Lu & Goebel, 2000; Aure *et al.*, 2000; Edvardsen *et al.*, 2007; Riisberg & Edvardsen, 2008; Jakobsen *et al.*, 2012; Clement *et al.*, 2016; Eckford-Soper & Daugbjerg, 2016; Hernández *et al.*, 2016; León-Muñoz *et al.*, 2018)。我が国でも、瀬戸内海や鹿児島県海域での赤潮出現および漁業被害の事例が報告されている (Yamamoto & Tanaka, 1990; Baba *et al.*, 1995; Kawaguchi *et al.*, 2007; Honda & Yoshimatsu, 2009; Orita *et al.*, 2012)。本藻は低水温かつ低照度環境下でも高い生育を示し (Honda & Yoshimatsu, 2009)、冬季にもブルームの形成が見られる。従って、本藻赤潮に対しては冬季も含めた周年のモニタリングが必要となる。しかしながら、本藻の生理生態や生活環については依然不明な点が多い。今後、鹿児島県海域への定着、さらには九州海域、西日本海域への生息域拡大が危惧される中、天然環境での本藻の動態解明は赤潮防除の観点から重要である。

赤潮原因藻類の多くは、ブルーム崩壊時に非運動性の休眠細胞(休眠シスト)を形成する (Imai & Yamaguchi, 2012)。シストは底泥中で越冬しながら成熟する。春季に環境条件が至適化すると、シストは発芽してふたたび増殖し、ブルームの形成に至る。このように、休眠シストは、次期ブルームのシード・ポピュレーションとしての機能を担っている。従って、休眠シストにおける休眠状態の打破とそれに続く発芽の過程の把握が赤潮発生予察の糸口となりうる。一方、*P. verruculosa* は、培養条件下複雑な生活環を示し、その細胞形態も多様である (Chang *et al.*, 2014)。単細胞性かつ遊泳性の栄養細胞は配偶子として機能し、融合して接合体を形成する。接合体は、細胞核分裂、細胞分裂を経て非遊泳性の細胞集塊を形成する。細胞集塊表層には栄養細胞が形成され、その栄養細胞が細胞集塊から離脱することにより生活環が完結する。本藻では、細胞集塊形成期が休眠シストに相当すると推察される。天然環境においても細胞集塊が形成されるのであれば、その動態把握は本藻による赤潮形成メカニズムの解明、ひいては赤潮予察技術の確立につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、*P. verruculosa* を原因種とする赤潮の防除と漁業被害の軽減を目的として、以下の事項に取り組んだ。1) リアルタイム定量 PCR (qPCR) を用いた *P. verruculosa* 定量法の確立、2) 培養条件下での *P. verruculosa* 生活環完結のための培養法の検討、特に本藻共存細菌と生活環との関連性、3) *P. verruculosa* の生活環、特に休眠期と推察される細胞集塊からブルーム形成の端緒となる栄養細胞が形成され遊離するまでの各過程の分子指標の確立。以上の取り組みで得た成果は、赤潮発生海域での赤潮原因種のモニタリングの迅速化や自動化、赤潮発生の早期検出、当該海域での赤潮出現可能性の評価およびそれに基づく赤潮発生予察に資すると考える。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム定量 PCR 法による *Pseudochattonella verruculosa* 定量化法の確立

鹿児島県山川湾より分離された *P. verruculosa* Yam14-01 株について、その葉緑体ゲノム DNA 上にコードされている光化学系 II D1 タンパク質遺伝子 *psbA* とリブローズニリン酸カルボキシラーゼ大サブユニット遺伝子 *rbcL* の間の領域および *rbcL* と 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) の間の領域を PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、オープンリーディングフレーム (ORF) とその遺伝子機能、トランスファー RNA 遺伝子のコード領域を推定した。また、得られた葉緑体ゲノム DNA 上に本藻特異的な qPCR 用プライマーを設計した。

既知細胞数の *P. verruculosa* Yam14-01 株を添加した天然海水および天然海底泥より環境 DNA を調製し、これらを検量線作成用の標準 DNA として qPCR を行った。qPCR に際しては、DNA 前増幅用試薬キット SSoAdvanced PreAmp Supermix (Bio-Rad) を用い、鋳型 DNA 前増幅の効果を検討した。

(2) *Pseudochattonella verruculosa* 共存細菌の分離、同定とその増殖

共存細菌の分離、同定

P. verruculosa NIES-670 株および NIES-850 株の継代培養液中に共存する細菌を Zobell 2216 寒天平板培地にて分離した。得られた細菌分離株から 16S rDNA を PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。塩基配列は相同性検索 BLAST に供し、高い同一性を示す細菌種を検索した。

Pseudochattonella verruculosa およびその共存細菌の増殖

ダイゴ IMK 培地 (日水製薬) 中、*P. verruculosa* NIES-850 株を 20°C、12L:12D の明暗条件

下培養し、経時的にその培養液を採取した。*P. verruculosa* の増殖は、培養液中の光合成色素量にて相対評価した。遠心分離により集藻した藻類細胞に 99.5%エタノールを加えて細胞を破碎し、光合成色素抽出液を得た。クロロフィルに由来する吸収極大波長 440 nm と 660 nm での吸光度を分光光度計にて測定した。*P. verruculosa* 培養液中の細菌数は、平板塗抹法により計数した。培養液を Zobell 2216 寒天培地に塗抹し、24°C にて 2 日間培養した。得られたコロニー数に基づき培養液中の細菌細胞密度を得た。

P. verruculosa 培養液から分離された共存細菌株 PvN8L1 について、培養液中での細菌数の推移を qPCR により相対的に評価した。経時的に採取した *P. verruculosa* NIES-850 株培養液を遠心分離に供し、藻類および細菌細胞を沈殿画分として回収した。得られた沈殿画分より環境 DNA を調製し、qPCR の鋳型 DNA とした。PvN8L1 株は *Thalassospira lucentensis* ときわめて高い近縁性を示した。そこで、GenBank DNA データベースに登録されている *T. lucentensis* 全ゲノム塩基配列(アクセッション番号 CP136684.1)を参照し、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA) クラスターの遺伝子間転写領域(ITS)上に PvN8L1 特異的 qPCR 用プライマーを設計した。*P. verruculosa* 特異的プライマーセットとともに qPCR を行い、PvN8L1 株および NIES-850 株の DNA 量を定量化した。なお、定量化に際しては、PvN8L1 株および NIES-850 株より得た全 DNA の希釈系列により検量線を作成した。

(3) *Pseudochattonella verruculosa* の生活環と遺伝子発現パターンの比較

逆転写定量 PCR による *psbA* 発現量の定量化

ダイゴ IMK 培地中、*P. verruculosa* NIES-850 株を 20°C、12L:12D の明暗条件下培養した。経時的に培養液を採取し、遠心分離にて藻類細胞を回収した。得られた本藻細胞から全 RNA を抽出精製した。*P. verruculosa* 葉緑体ゲノム DNA にコードされている *psbA* 遺伝子上にプライマーを設計し、本藻全 RNA を鋳型として逆転写定量 PCR (RT-qPCR) を行った。*psbA* 発現量は検量線を用いた相対定量法 (PCR 効率補正モデル) にて定量化し、その際のリファレンス遺伝子として 18S rDNA または 28S リボソーム RNA 遺伝子 (28S rDNA) を用いた。

Pseudochattonella verruculosa の網羅的トランスクリプトーム解析

ダイゴ IMK 培地にて培養した *P. verruculosa* NIES-670 株について、その単細胞性遊泳細胞期および細胞集塊形成期にある藻類細胞を遠心分離にて回収し、全 RNA を調製した。得られた全 RNA は株式会社生物技研に委託し RNA-Seq 解析に供した。*de novo* transcriptome assembly により得られた塩基配列(リード)から遺伝子カタログ(コンティグ)を得た。その遺伝子カタログを Diamond (Buchfink *et al.*, 2014) による相同性解析に供し、遺伝子の注釈付け(アノテーション)を行った。

4. 研究成果

(1) リアルタイム定量 PCR 法による *Pseudochattonella verruculosa* 定量化法の確立

P. verruculosa 葉緑体ゲノム DNA 上の *psbA-rbcL* および *rbcL-16S rDNA* の各領域について、それぞれ 15,048 bp、24,619 bp の塩基配列を決定し、コードされている遺伝子の機能についてアノテーションを行った。その結果は Yoshikawa *et al.* (2024) に示す。

得られた葉緑体ゲノム DNA の部分塩基配列とその遺伝子マップに基づき、遺伝子間領域に本藻特異的な qPCR 用プライマーセットを設計した。細胞数既知の *P. verruculosa* を添加した天然海水および天然海底泥の環境 DNA を鋳型に qPCR を行い検量線を作成した。その結果、*P. verruculosa* 細胞数と Ct 値の高い相関が見られ(図 1-1)、天然試料中の本藻の定量化が可能であることが示された。また、鋳型 DNA の前増幅により Ct 値が 6 ないし 7 程度減少し、かつ定量性も維持された(図 1-2)。従って、前増幅は検出感度の向上に有効と思われる。本 qPCR の結果から、細胞あたりの DNA 含量は 0.180~0.267 pg cell⁻¹ と見積もられた。この値を用いれば、本藻 DNA の希釈系列にて qPCR 検量線を作成し、得られた定量値から細胞数を算出することも可能となる。

(2) *Pseudochattonella verruculosa* 共存細菌の分離、同定とその増殖

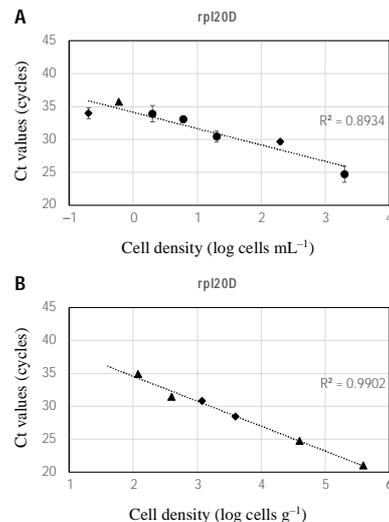


図 1-1. qPCR により得た環境 DNA の検量線。A, 天然海水; B, 天然海底泥。

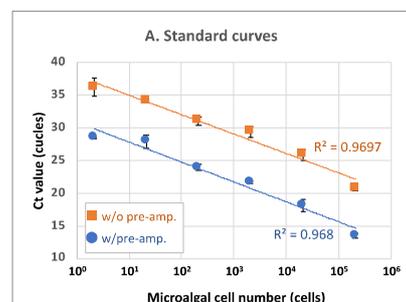


図 1-2. qPCR に際しての前増幅処理の効果。

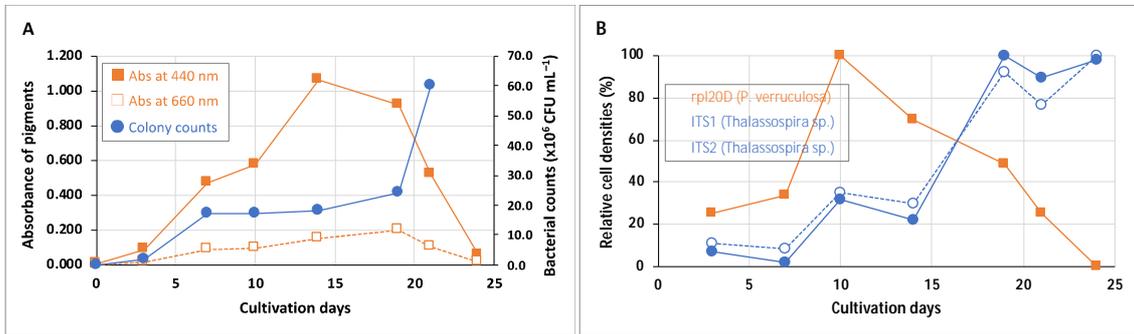


図 2-1. *P. verruculosa* 培養液での共存細菌および *P. verruculosa* の増殖. A, 平板塗抹法による細菌生菌数および光合成色素量; B, qPCR.

P. verruculosa の培養液中に共存する細菌を分離し、16S rDNA 塩基配列に基づく相同性検索を行った結果、NIES-670 株の共存細菌は *Seohaecicola* 属に、NIES-850 株のそれは *Thalassospira* 属や *Alloalcanivorax* 属に属することが示された。

Seohaecicola 属は、好気性光合成細菌 Roseobacteria 科に属する。好気性光合成細菌は、ビタミン類を供給するなど赤潮原因藻類との栄養共生関係が報告されており (Lafay *et al.*, 1995; Prokic *et al.*, 1998)、赤潮ブルームの形成や維持に何らかの役割を担っていると考えられている (Schafer *et al.*, 2002; Rooney-Varga *et al.*, 2005; Sala *et al.*, 2005; Garcés *et al.*, 2007)。一方、NIES-850 共存細菌が類縁性を示した *Alloalcanivorax dieselolei* や *Alloalcanivorax xenomutans* は石油分解細菌として知られ、アルカンやディーゼル油などの分解能、利用能を持つ (Liu & Shao, 2005; Rahul *et al.*, 2014)。また、*Thalassospira permensis* はナフタレン分解細菌が生成する二次代謝産物 (ナフタレン分解産物) を資化している (Plotnikova *et al.*, 2011)。特に、*Alloalcanivorax* 属 (*Alcanivorax* 属) は、清浄な海洋環境ではほとんど検出されず、石油汚染発生時にのみその汚染環境特異的に出現するとされている (Yakimov *et al.*, 2007)。そのような細菌群の赤潮原因藻類種との共存は、培養環境での藻類細胞の分解とその成分の資化、さらには天然環境でのブルーム崩壊との関連性を示唆させる。

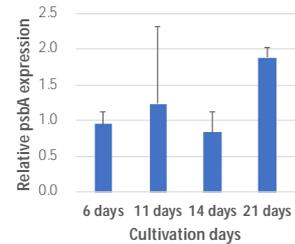


図 3-1. *psbA* 発現量の推移

P. verruculosa NIES-850 培養液中での本藻および共存細菌の増殖の推移を、それぞれ光合成色素量および平板塗抹法により調べた。その結果、*P. verruculosa* は培養開始から 15 日で最大値を示した後、19 日目以降に死滅期へと移行した (図 2-1A)。一方、共存細菌は、*P. verruculosa* が死滅期に入った段階でその数を増加させた (図 2-1A)。この増殖の様子は qPCR でも確認された (図 2-1B)。共存細菌の増加に伴う *P. verruculosa* 減少の様子から、共存細菌は *P. verruculosa* の増殖後期に藻類細胞を分解、溶藻し、その成分を資化していることが示唆される。実際に、培養後期に形成された本藻の細胞集塊が、単細胞性遊泳細胞 (栄養細胞) を形成することなく溶藻する様子が観察される。以上の結果から、細胞集塊以降の生活環を完結させるためには共存細菌の制御が重要と思われる。

(3) *Pseudochattonella verruculosa* の生活環と遺伝子発現パターンの比較

光化学系 II 複合体は、光合成における水分子分解の役割を担っている。その複合体を構成するコアタンパク質サブユニットの一種、D1 タンパク質は、葉緑体ゲノム DNA 上の *psbA* 遺伝子にコードされている。*psbA* の発現は光合成活性と密接に関連しており、光合成活性を測る指標となりうる。そこで、*P. verruculosa* の生活環各段階での *psbA* 発現量 (mRNA 量) を RT-qPCR により評価した。*psbA* の発現量は、培養日数ごとに多少の増減が認められるものの、明確な増殖段階、生活環段階との関連性は認められなかった (図 3-1)。従って、光合成活性が生活環によって制御される可能性は低いと思われる。

単細胞性遊泳細胞期および細胞集塊形成期にある *P. verruculosa* NIES-850 の RNA-Seq 解析の結果、計 15 万 3230 個のコンティグからなる遺伝子カタログを得た。そのうち各期の間で有意な発現量の差を示したコンティグは 6 万 3208 個であった。発現量の有意差の指標となる q 値 (false discovery rate, FDR) に基づき、最も発現量が異なると判断される上位 100 コンティグについて遺伝子アノテーションを行った。その結果、電子伝達系、細胞分裂、タンパク質合成など、エネルギー代謝や生合成といった基本的な代謝機能が細胞集塊形成期に抑制された。このことは、細胞集塊が一種の休眠状態にあることを示唆している。一方、分子シャペロンや光合成関連遺伝子の発現が細胞集塊形成期に促進された。細胞集塊は対数増殖期後期から定常期にかけて形成されることから、培養環境中ストレスが負荷された状態にあると思われる。このことが分子シャペロンの発現促進に関連していると考えられる。また、前述のとおり、細胞集塊は一種の休眠状態にあると推察されるが、細胞集塊形成期後期には、栄養細胞である単細胞性遊泳細胞を形成する。栄養細胞の形成とその後の増殖に備えて、あらかじめ光合成機能を回復させる必要がある。その回復の一過程として、光合成関連遺伝子発現が促進されたものと考えられる。

P. verruculosa が形成する細胞集塊が、他の赤潮原因藻類の休眠シストで指摘されているシード・ポピュレーションとして機能するのであれば、次期ブルーム形成は細胞集塊内での単細胞性遊泳細胞の形成、遊離に端を発すると言える。従って、遊泳細胞形成時に誘導されると思われる鞭毛の形成、その形成に関与する鞭毛関連タンパク質遺伝子は、赤潮ブルーム形成の分子指標として期待される。しかしながら、本トランスクリプトーム解析では、キネシンで細胞集塊形成期の高い発現を認めたものの、ダイニンなどその他の鞭毛関連タンパク質遺伝子の発現には各期の間での有意な差異が認められなかった。

<引用文献>

- Aure J, Danielssen DS, Skogen M, *et al.* In: Harmful algal blooms 2000. (eds) Hallegraeff GM, Bolch CJS, Blackburn I, *et al.*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 2001.
- Baba T, Momoyama K, Hiraoka M, *et al.* *Bull Yamaguchi Pref Naikai Fish Exp St*, 24: 121–122, 1995.
- Chang FH, Sutherland JE, McVeagh M, *et al.* *Harmful Algae*, 34: 42–55, 2014.
- Clement A, Lincoquero L, Saldivia M, *et al.* *Harmful Algae News*, 53: 1–3, 2016.
- Eckford-Soper LK, Daugbjerg N. *J Phycol*, 52: 174–183, 2016.
- Edvardsen B, Eikrem W, Shalchian-Tabrizi K, *et al.* *J Phycol*, 43: 1054–1070, 2007.
- Garcés E, Vila M, Reñé A, *et al.* *Aquat Microb Ecol*, 46: 55–70, 2007.
- Hernández C, Díaz PA, Molinet C *et al.* *Harmful Algae News*, 54: 1–2, 2016.
- Honda K, Yoshimatsu S. *Bull Akashiwo Res Inst Kagawa Pref*, 7: 1–8, 2009.
- Imai I, Yamaguchi M. *Harmful Algae*, 14: 46–70, 2012.
- Jakobsen R, Hansen PJ, Daugbjerg N, *et al.* *Harmful Algae*, 18: 84–95, 2012.
- Kawaguchi O, Takatsuji H, Murakami T, *et al.* *Bull Hiroshima Pref Fish Mar Technol Cent*, 2: 21–27, 2007.
- Lafay B, Ruimy R, de Traubenberg CR, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 45: 290–296, 1995.
- León-Muñoz J, Urbina MA, Garreaud R, *et al.* *Sci Rep*, 8: 1330, 2018.
- Liu C, Shao Z. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 1181–1186, 2005.
- Lu D, Goebel J. *Harmful Algae News*, 21: 10–11, 2000.
- Orita K, Nishi H, Tahara Y, *et al.* *Bull Kagoshima Pref Fish Technol Develop Cent*, 4: 17–23, 2012. (in Japanese)
- Plotnikova EG, Anan'ina LN, Krausova VI, *et al.* *Microbiology*, 80: 703–712, 2011.
- Prokic I, Brummer F, Brigge T, *et al.* *Protist*, 149: 347–357, 1998.
- Rahul K, Sasikala Ch, Tushar L, *et al.* *Int J Evol Microbiol*, 64: 3553–3558, 2014.
- Riisberg I, Edvardsen B. *Eur J Phycol*, 43: 413–422, 2008.
- Roony-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, *et al.* *Microb Ecol*, 49: 153–175, 2005.
- Sala MM, Balagué V, Pedrós-Alió C, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 54: 257–267, 2005.
- Schafer H, Abbas B, Witte H, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 25–35, 2002.
- Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. *Curr Opin Biotechnol*, 18: 257–266, 2007.
- Yamamoto C, Tanaka Y. *Bull Fukuoka Fish Exp St*, 16: 43–44, 1990.
- Yoshikawa T, Wan JJ, Bao DQ, *et al.* *DNA Polymorphism*, 32: (accepted), 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Yoshikawa, Jiu Jiu Wan, Do Quoc Bao, Suguru Okunishi, Hiroto Maeda	4. 巻 32
2. 論文標題 Quantification of cultivated <i>Pseudochattonella verruculosa</i> (Dictyochophyceae) by plastid gene-targeted quantitative PCR	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DNA Polymorphism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------