

機関番号: 27103

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20580210

研究課題名(和文) 世界の海の牧草スケルトネマの種多様性と分類の再構築

研究課題名(英文) Species diversity of pasture grass *Skeletonema* in the world sea and assessment of its classification

研究代表者

山田 真知子(YAMADA MACHIKO)

福岡女子大学・人間環境学部・教授

研究者番号: 30438303

研究成果の概要 (和文):

2007年10月~2009年12月まで毎月1回、産業港である洞海湾の *Skeletonema* 属の同定を SEM 形態観察と rDNA 解析を用いて試みた。LSU rDNA では *S. dohrnii*, SSU rDNA では *S. marinoi* と同定された種は *S. marinoi-dohrnii* complex と表記した。*S. ardens*, *S. costatum* s.s., *S. japonicum*, *S. marinoi-dohrnii* complex, *S. menzelii*, *S. pseudocostatum*, および *S. tropicum* の7種が同定され、3種が我が国で初めて報告となる。これらは遷移しながら出現し *S. costatum* s.l. の周年にわたる出現を支え赤潮を構成した。*Skeletonema* の各月の単離種類数は1~4種で全調査期間では7種と、洞海湾では *Skeletonema* 属の種多様性が高い。

研究成果の概要 (英文):

Seven *Skeletonema* species were identified at one station in the industrial harbor Dokai Bay, Japan, in October 2007 and then monthly from January 2008 to December 2009 by morphological scanning electron microscopy observations and molecular analyses of mainly the large subunit (LSU) rDNA. We refer to one species identified as *S. dohrnii* using LSU rDNA, but as *S. marinoi* using the small subunit (SSU) rDNA and consequently we use the term *S. marinoi-dohrnii* complex. This is the first time that *S. ardens*, *S. costatum* s.s., and *S. pseudocostatum* have been recorded in Japan and that *S. menzelii* and *S. tropicum* have been identified by molecular methods in Japan. The *S. marinoi-dohrnii* complex was isolated with high frequency all year-round, and *S. japonicum* was also isolated with high frequency but not so in summer. *S. tropicum* was isolated from September to December, but *S. ardens* and *S. costatum* s.s. were isolated only when the water temperature exceeded 20°C. *S. pseudocostatum* bloomed just once, in summer, but *S. menzelii* was isolated in May and again in October. The continuous year-round occurrence of *S. costatum* s.l. in the bay is supported by the succession of these seven species. Six of the species, except *S. menzelii*, were important components of algal blooms in the bay. One to four species of *Skeletonema* were isolated every month. Monthly species diversity was higher when *S. ardens*, *S. costatum* s.s., and *S. tropicum* that are usually associated with tropical or subtropical waters, were isolated. In general, species diversity of the genus *Skeletonema* was very high in Dokai Bay.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般 6301

キーワード： *Skeletonema*、種多様性、DNA、電子顕微鏡、分類、植物プランクトン、珪藻類、海の牧草

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの植物プランクトンの中で珪藻類は分裂速度が速いため海の基礎生産の大部分を占めており、その中でも *S. costatum* は世界の海に出現するコスモポリタンであることから「海の牧草」と呼ばれ、EPA のバイオアッセイの供試藻としても使用されている。また、近年の富栄養化に伴い東京湾や大阪湾さらにチェサピーク湾やバルト海など後背に大都市を擁する海域において赤潮も頻繁に形成することから、富栄養度の生物指標にも使用されている。最近 14 年間の世界の *Skeletonema* に関する論文数は 588 篇で、このうち本種に関する論文は 548 編にのぼる。

(2) *S. costatum* は種々の環境要因や水質汚濁要因に耐性があり適応能力が高いために世界の各海域に四季にわたって出現できると考えられていた。ところが、D. Sarno らが 2005 年及び 2007 年に、rDNA 分子解析と電顕形態解析を用いた同定法を提案したことから、本属には新種を含め 11 種存在することが明らかになった。*S. costatum* は 8 種で構成されていたからこそコスモポリタンに成り得たのであり、この D. Sarno らの報告はこれまでの本種に関する論文の見直しと新たな分類にもとづいた調査や実験が必要であることを提示した。

2. 研究の目的

(1) D. Sarno ら (2005・2007) が考案した *Skeletonema* 属の新分類法の検証を行なう。

(2) 我が国沿岸海域における *Skeletonema* 属各種の出現状況を調査し、これらの生物地理学を解明する。

(3) 各海域における *Skeletonema* 属単離時の水質調査結果と出現種を対比させることにより、*Skeletonema* 属各種の出現特性（生態特性）を解明する。

(4) D. Sarno ら (2005・2007) の考案した新分類法は煩雑で同定に時間を要する。そのため、海域現場で植物プランクトンをモニタリングする水産技術者がこの方法を用いることは現実的ではない。そこで、今回の研究から得られた成果を基に、新たに簡便で精度の高い分類法を構築する。

3. 研究の方法

(1) サンプルング：各海域では採水は 1 年間にわたり毎月 1 回、採泥は 1 回実施する。海水は表層を、海底泥は表泥を採取する。併せて水温、塩分、栄養塩などの水質調査も実施する。

(2) 株の単離・クローン培養：海水中に浮遊している栄養細胞と海底泥からの発芽細胞をマイクロピペット法で単離する。我が国の海域での定着種を特定するために、発芽細胞を調査する。なお、発芽水温は 10、15、20、25 および 30℃ の 5 段階を設定して実験を行い、発芽種にとって好適な発芽水温も調査する。

(3) 同定：形態解析は SEM を用いて行う。遺伝子解析では LSU rDNA の塩基配列を調べる。同定した株の塩基配列は、すべて遺伝子データバンク (GenBank) に登録する。

(4) 現場出現特性：現場の水温、塩分、栄養塩などの環境要因と *Skeletonema* 各種の出現との関係、分布、および季節的消長との関連を調査する。

(5) 生理学的特性：*Skeletonema* 各種の水温・光強度、塩分や栄養塩などの環境要因に対する増殖特性を、光合成活性などを指標とする培養実験で調査する。

(6) 総合解析：得られた全ての結果を総合的に検討し、*Skeletonema* 各種の生理生態（発芽）特性を解明するとともに、我が国における *Skeletonema* 属の種多様性と各種の生物地理学を明らかにする。さらに、これらの結果をもとに、海水温の上昇が *Skeletonema* 各種の分布や消長に及ぼす影響を予測し、*Skeletonema* という植物プランクトンについて海食物連鎖の出発点の変移が高次の生態系や魚類生産、海洋環境に及ぼす影響も検討予測する。

4. 研究成果

ここでは、*J. Oceanogr* (2010, **66**, 755-771) に掲載された「北九州市洞海湾における *Skeletonema* 属の種多様性」について報告する。

(1) 同定結果

① 調査は 2007 年 10 月と 2008 年 1 月から

2009年12月まで毎月1回の計25回実施した。洞海湾から約231株を単離し同定を行なった結果、洞海湾には *S. ardens*, *S. costatum* s.s., *S. japonicum*, *S. marinoi-dohrnii* complex, *S. menzelii*, *S. pseudocostatum* および *S. tropicum* の7種が出現することが確認された。

② それらの電子顕微鏡像を、図1に示す。洞海湾から単離された *Skeletonema* 属7種の形態的特徴はD. Sarnoら(2005・2007)の報告とよく一致したが、*S. japonicum* のTFPPがnarrow型ではなくwider型であることが異なっていた。

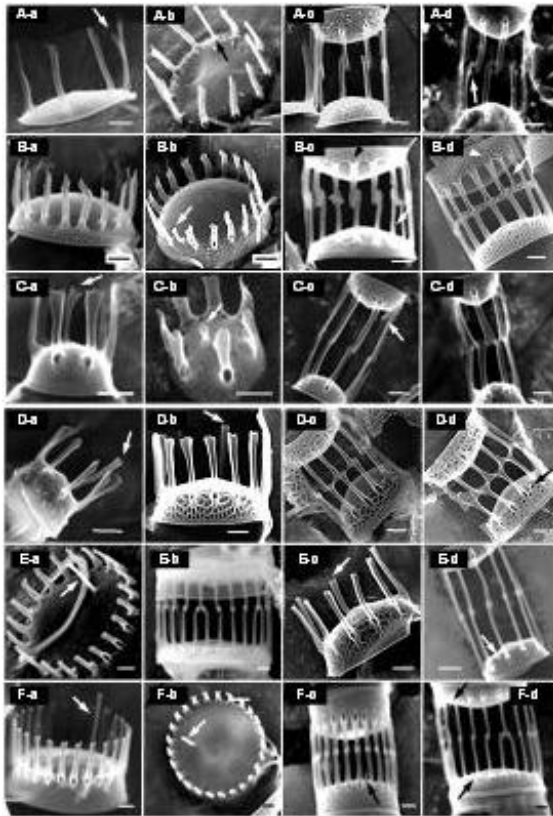


図1 洞海湾から単離された *Skeletonema* spp. の走査型電子顕微鏡像

バー, 1 μ m. (A) *S. ardens* (a), (b), (c) and (d), strain FDK003: (a) and (b), terminal valve with TFPPs and a TRPP (arrow); (c), intercalary valves with IFPPs; (d), IFPP with a rectangular lateral expansion (arrow). (B) *S. costatum* (a), (b), and (c), strain FDK011; (d), strain FDK015: (a) and (b), terminal valve with TFPPs and a TRPP (arrow); (c) and (d), intercalary valves with IFPPs with an external pore (arrowhead) at their base, and a IRPP (arrow). (C) *S. dohrnii* or *S. marinoi* (a), (b), (c) and (d), strain FDK026: (a) and (b), terminal valve with TFPPs and a TRPP (arrow); (c) and (d), intercalary valves with IFPPs and a IRPP (arrow). (D) *S. japonicum* (a), strain FDK186;; (b), strain FDK160; (c) and (d), strain FDK177: (a) and (b), terminal valve with

TFPPs and a TRPP (arrow); (c) and (d), intercalary valves with IFPPs and a IRPP (arrow). (E) *S. pseudocostatum* (a) and (b), prepared from the surface water sample collected for counting cell density of *Skeletonema* spp. on 10 August 2008; (c) and (d), Strain FDK225 prepared from rejuvenated species from the bottom sediment collected on 24 August 2007: (a) and (c), terminal valve with TFPPs and a TRPP (arrow); (b) and (d), intercalary valves with IFPPs and a IRPP (arrow). (F) *S. tropicum* (a), (b) and (d), FDK207; (c), strain FDK200: (a) and (b), terminal valve with TFPPs and a TRPP (arrow); (c) and (d), intercalary valves with IFPPs and a IRPP (arrow).

③ 洞海湾から分離された231株のLSU rDNA塩基配列について、木村2変数法を用いてNJ法(近隣結合法)で系統樹を描き、図2に示した。この図から示されるように、*S. ardens*, *S. costatum* s.s., *S. japonicum*, *S. dohrnii*, *S. menzelii*, *S. pseudocostatum* および *S. tropicum* の7種が同定された。

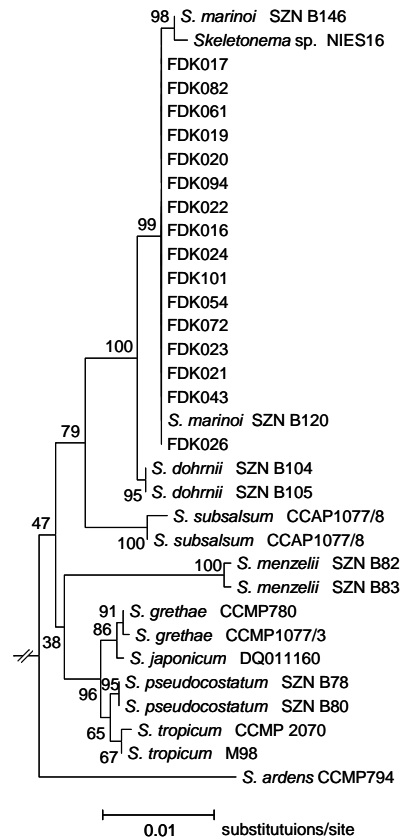


図2 SSU rDNAを用いた洞海湾産 *Skeletonema* 属33株の近隣結合系統図

このうち、*S. dohrnii* については SSU rDNA 塩基配列を用いて同様に解析した結果、図 3 に示されるように、本種は *S. marinoi* という別種に同定されることが確認された。このことから、本種は *S. marinoi-dohrnii* complex と表記することとした。

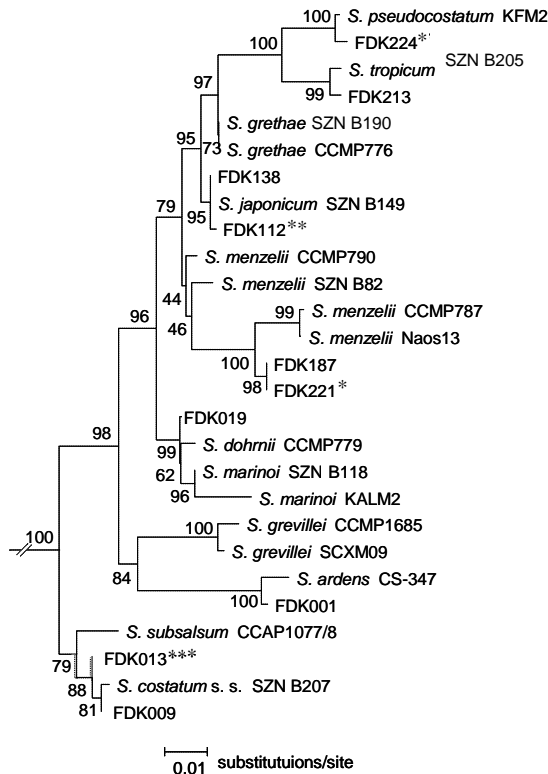


図 2 LSU rDNA を用いた洞海湾産 *Skeletonema* 属 27 株の近隣結合系統図

(2) 季節的消長

図 4 に示すように、洞海湾において *S. japonicum* と *S. marinoi-dohrnii* complex の 2 種が優占的に出現し、前者は秋季～春季に、後者は周年にわたって出現した。*S. ardens* および *S. costatum* s.s. の 2 種は夏季から秋季にわたって、*S. tropicum* は夏季から初冬に渡って出現した。5 月と 10 月には *S. menzelii* が出現し、夏季に 1 回 *S. pseudocostatum* が同定された。この報告で用いている方法は半定量的で

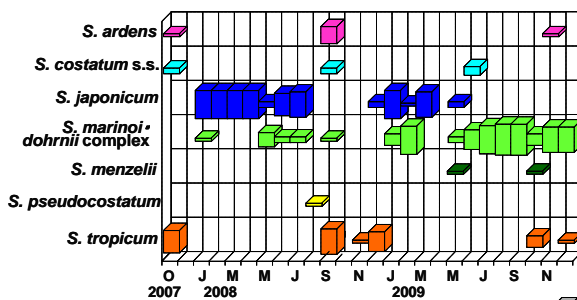


図 4 北九州市洞海湾における *Skeletonema* 各種の季節的消長

あるが、このように洞海湾の *Skeletonema* 属各種には、季節的消長が認められた。

(3) 種多様性

表 1 に示すように、洞海湾において各月に分離された *Skeletonema* 属の種類数は 1 種から 4 種であった。これまで報告されている 1 試料からの *Skeletonema* 属の種類数の最高値は 3 種 (Kooistra *et al.*, 2008) で、洞海湾より少ない。また、一つの内湾から分離された *Skeletonema* 属各種の種類数の最高値はナポリ湾の 4 種 (Kooistra *et al.*, 2008) であった。以上のことから、洞海湾では種多様性が極めて高いことがわかる。

表 1 洞海湾から各月に分離された *Skeletonema* 属の種類数

月	年		
	2007	2008	2009
1 月		2	2
2 月		1	2
3 月		1	1
4 月		1	-
5 月		2	3
6 月		2	2
7 月		2	1
8 月		1	1
9 月		4	1
10 月	3	1	3
11 月		1	2
12 月		2	2
各年計	-	6	6
3 カ年計		7	

(4) まとめ

① *Skeletonema* 属は、図 4 や表 1 に示されるように、洞海湾では周年にわたって出現し、高水温期には赤潮も形成する最も重要な植物プランクトンである (山田ら, 2011)。これまで洞海湾では *S. costatum* s.l. と *S. tropicum* の 2 種が出現するとされていたが、今回の調査から、7 種の *Skeletonema* 属が交替しながら出現することにより、本属の周年にわたる出現が維持され、赤潮も形成していたことが確認された。また、洞海湾における *Skeletonema* 属の出現種類数は 7 種と、我が国や世界の内湾での場合と比較し、極めて高いことが確認された。

② 今回、洞海湾から分離された *Skeletonema* 属 7 種の水温に対する増殖特性を培養実験で調べた (Kaeriyama *et al.*, 2011) 結果、野外でのこれらの出現季節に対応するような実験結果が得られた。このことから、*Skeletonema* 属の季節的な遷移には水温の変化が関与していることが示唆された。

③ 最近、遺伝子解析により植物プランクトン、とくに珪藻類の種の同定が正確になされるようになったが、従来の海洋生態学に手法がこれに対応していないことが指摘されている (T. Smayda, 2011)。本報告は最新の同定法を用いて、海洋生態学の解明を試みている。今回の手法を我が国の他の内湾にも適用して、*Skeletonema* 属の多様性解明を試みるとともに、簡便な *Skeletonema* 属の同定法開発に取り組んでいきたい。

(5) 文献

Sarno, D., W. H. C. F. Kooistra, L. K. Medlin, I. Percopo and 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, 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.

Kooistra, W. H. C. F., D. Sarno, S. Balzano, H. Gu, R. A. Andersen and A. Zingone (2008): Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, **159**, 177-193.

Smayda, T (2011) : Cryptic planktonic diatom challenges phytoplankton ecologists. *PNAS*, **108**, 4269-4270.

山田ら、2011とKaeriyama et al., 2011は、「5. 主な発表論文等の〔雑誌論文〕の①と②」を参照されたい。

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 Hideki Kaeriyama, Eri Katsuki, Mayuko Otsubo, Machiko Yamada, Kazuhiko Ichimi, Kuninao Tada and Paul 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.*, (accepted).
- ① 山田真知子・上田直子・濱田建一郎 (2011) : 過栄養海域である洞海湾における栄養度の低下とそれに伴う赤潮発生状況の変化, 日本水産学会誌, 査読有, 受理
- ② Yamada, M., E. Katsuki, M. Otsubo, M. Kawaguchi, K. Ichimi, H. Kaeriyama, K.

Tada and P. J. Harrison(2010) : Species Diversity of the Genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in the Industrial Harbor Dokai Bay, Japan. *J. Oceanogr.*, **66**, 755-771.

- ③ 山田真知子・香月絵理・大坪繭子・濱田建一郎・上田直子・門谷茂 (2009) : 熱帯・亜熱帯性海産珪藻 *Skeletonema tropicum* の温帯域内湾 (洞海湾) における生存戦略, 海の研究, 査読有, **18**, 157-167.
- ④ Suksomjit, M., Tada, K., Y. Funaki, S. Montani, M. Yamada and P. Harrison(2009) : AmtrnoniuIn accelerates the the growth rate of *Skeletonema* spp.in the phytoplankton assemblage in a heavily eutrophic embayment, Dokai Bay, Japan. *La mer*, **47**, 89-101.
- ⑤ 山田真知子・香月絵理・大坪繭子 (2009) : 瀬戸内海の代表的な植物プランクトン *Skeletonema* 属の種多様性と季節的消長, 瀬戸内海, **58**, 51-53.
- ⑥ Tada, K., M. Suksomjit, Y. Funaki, S. Montani, M. Yamada and P. Harrison (2009) : Diatoms grow faster using ammonium in rapidly flushed eutrophic Dokai Bay, Japan, *J. Oceanogr.*, **65**, 885-891.

〔学会発表〕(計13件)

- ① 藤野佑美・大坪繭子・山田真知子・小倉久子・児玉真史・一見和彦・多田邦尚 : 東京湾の海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性 (2010年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2010年10月9日、柏)
- ② 田代紗菜・山田真知子・大坪繭子・日高朋子・山本圭吾・一見和彦・多田邦尚 : 大阪湾における海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性 (2010年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2010年10月9日、柏)
- ③ 馬場千英・田代紗菜・大坪繭子・山田真知子・中野義勝・児玉真史・一見和彦・多田邦尚 : 我が国の沿岸海域に出現する珪藻 *Skeletonema* 属の形態学的特徴の検討 (2010年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2010年10月9日、柏)
- ④ 山田真知子・大坪繭子・日高朋子・山本圭吾・一見和彦・多田邦尚 : 大阪湾における海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性 (平成22年度日本水産学会秋季大会、2010年9月24日、京都)
- ⑤ 山田真知子・香月絵理・大坪繭子・一見和彦・多田邦尚 : 洞海湾における *Skeletonema* 属の種多様性 (2009年度日本

- 海洋学会秋季大会、2009年9月28日、京都)
- ⑥ 河口真弓・大坪繭子・山田真知子・香月絵理・帰山秀樹・一見和彦・多田邦尚:洞海湾における海産珪藻 *Skeletonema* 属の生理生態特性I季節的消長と種多様性 (2009年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2009年9月17日、函館)
 - ⑦ 帰山秀樹・河口真弓・大坪繭子・山田真知子・香月絵理・一見和彦・多田邦尚:洞海湾における海産珪藻 *Skeletonema* 属の生理生態特性II*Skeletonema* 属の増殖に及ぼす温度および光強度の影響 (2009年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2009年9月17日、函館)
 - ⑧ 日高朋子・大坪繭子・山田真知子・一見和彦・多田邦尚:西日本の3海域の海底泥から発芽した海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性 (2009年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2009年9月17日、函館)
 - ⑨ Machiko YAMADA, Naoko UEDA and Ken-ichiro HAMADA: Change in red tide occurrence with decline in eutrophic level in hyper-eutrophic environment, Dokai Bay, Japan (Workshop on Phytoplankton Dynamics and Coastal Environment with Professor Paul J. Harrison, 26 May, 2009, Kagawa)
 - ⑩ 香月絵理・大坪繭子・山田真知子・一見和彦・多田邦尚:洞海湾における *Skeletonema* 属の種多様性 (2008年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2008年9月6日、熊本)
 - ⑪ 山田真知子:洞海湾における栄養度低減に伴う赤潮発生状況の変化 (平成20年度瀬戸内海研究フォーラム in 福岡、2008年9月4日、北九州)
 - ⑫ 田中 全・一見和彦・山田真知子・多田邦尚:洞海湾から分離された *Skeletonema* 属の温度適応性 (平成20年度瀬戸内海研究フォーラム in 福岡、2008年9月4日、北九州)
 - ⑬ 香月絵理・大坪繭子・山田真知子・一見和彦・多田邦尚:瀬戸内海の代表的な植物プランクトン *Skeletonema* 属の種多様性 (平成20年度瀬戸内海研究フォーラム in 福岡、2008年9月4日、北九州)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 真知子 (YAMADA MACHIKO)
福岡女子大学・人間環境学部・教授
研究者番号: 30438303

(2) 研究分担者

大坪 繭子 (OTSUBO MAYUKO)
福岡女子大学・人間環境学部・助手
研究者番号: 70336965