

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03068

研究課題名(和文) 赤潮プランクトン休眠細胞の「目覚め」を電気化学操作で制御：電位応答発芽機構の解明

研究課題名(英文) Management of germination of harmful dinoflagellates cyst by electrochemical techniques

研究代表者

伊藤 真奈 (Ito, Mana)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員

研究者番号：60735900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：底質に形成される有毒プランクトンのシスト(休眠細胞)において、シスト形成・休眠・発芽の過程における細胞内の代謝プロファイリング情報(代謝物・遺伝子発現)を取得した結果、細胞内の遺伝子および代謝物を大きく変動させ、シストの発芽および増殖に向けて備えていることが明らかとなった。また、底質電位が低く還元的な環境で発生する遊離硫化物のシストへの影響を検討した結果、遊離硫化物の曝露がシストの発芽を抑制することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤潮プランクトンシストは底質に沈降・蓄積され、数十年もの間、発芽能を保持し続ける種も多数存在することから、シストに対する抜本的な対策が講じられない限り赤潮発生リスクは長期にわたって継続する。本研究において、シストの形成・休眠・発芽に至るまでの細胞内因子の変動を明らかにしたことは、シストの発芽制御に向けて大きく貢献するものである。また、本研究にて得られた、底質環境因子がシスト発芽抑制効果を有する事象は、底質環境の管理が赤潮発生を抑制技術の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Some harmful dinoflagellate species have a life history of cyst and deposit in marine sediment during that stage. Remarkable changes in gene expression and metabolites associated with photosynthesis, glycolysis, and TCA cycle were dependent on the cyst condition: cyst formation, dormancy, and germination period. Free sulfide, which is generally produced under the low redox potential conditions in sediment, caused alterations in both gene expression and metabolites in cyst and suppressed the cyst germination.

研究分野：沿岸底質評価

キーワード：有毒プランクトン シスト 発芽 底質電位

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

麻痺性貝毒の原因プランクトンの中でも *Alexandrium* 属による漁業被害は特に大きく、全国各地で毎年問題となっているものの、抜本的な解決策が講じられていないのが現状である。本属はシスト(休眠細胞;プランクトンの孢子体)を底泥中に形成し、次の増殖期に備える生活史を有する。底泥に蓄積するシストは長期間発芽能を保持し続けることから、シストに対する抜本的な対策が講じられない限り、赤潮や貝毒の発生リスクは長期に渡って継続する。

しかしながら、微細藻類ではシストの形成から発芽における内因的制御機構は未解明な点が多いのが現状である。また、シストが蓄積する底泥の環境は海底地形や有機物の負荷などに伴い、生物・物理・化学的に多様であり、それらがシストに影響を及ぼすことが想定される。これまでに光条件や溶存酸素量がシストの発芽に影響を及ぼすことが知られているが、底質の酸化還元状態とシスト発芽との関係性は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、まずシストの形成から休眠、発芽に向けてシストの生物体内で生じている変動について、代謝プロファイリング情報(代謝物・遺伝子発現)を取得し、発芽の制御機構を考察する。また、底質の酸化還元状態の指標である電位に着目し、シストの発芽へ及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1) シスト発芽に関する代謝プロファイリング情報解析

休眠から発芽に向けてシストの細胞内で変化する発現遺伝子および代謝物を特定するため、図1に示す合計4ステージ(シストの stage A, B, C, および Vegetative cell)のプランクトン細胞を調整した。Stage A はシストが形成された直後であり、体内にクロロフィルを多く含む。Stage B は休眠期であり、クロロフィルは消失しており、Stage C は発芽にむけてクロロフィルを形成している状態を示す。各サンプル細胞から mRNA 抽出し、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム(RNA-seq)解析を実施した。また、シストから代謝物を抽出し、代謝物総体メタボローム解析を実施した。

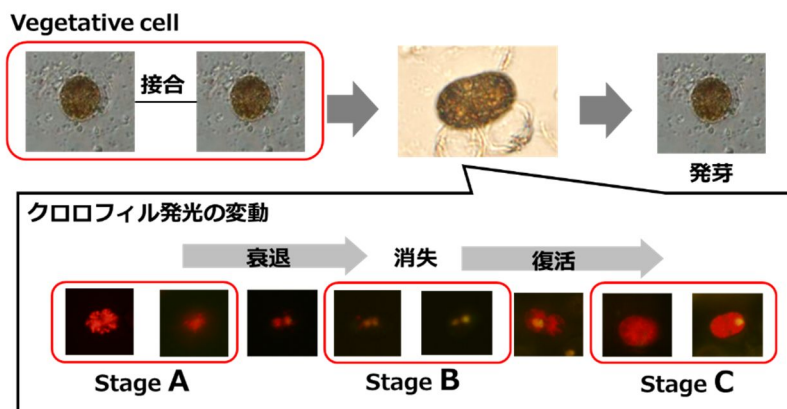


図1 *Alexandrium* 属のシストにおけるクロロフィル量の変動

#### 2) シストの電位への応答解析

電位の変化がシストの発芽に直接的に影響を及ぼすのか検討するため、底質を含まない条件(海水のみ)にて電位を人為的に操作し(±100-300V (Ag/AgCl))、シストの発芽状況を観察した。

#### 3) 底質中還元物質のシスト発芽への影響評価

有機物の負荷などにより底質が還元的環境になると底質電位は低下し、硫化水素が発生する。そこで、高い還元力を有する硫化水素ナトリウム( $\text{Na}_2\text{S}$ )を f/2 培地に溶解し、2 濃度区(0.5 mM および 1.0 mM)に設定した遊離硫化物にシストを1日または3日間曝露後、硫化物イオンを含まない清浄な培地にて培養することでシスト発芽への影響を検証した。また、シストを死滅させない低濃度(0.5 mM)での曝露時におけるシスト生体内因子の変動を明らかにするため、RNA-seq およびメタボローム解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### 1) シスト発芽に関する代謝プロファイリング情報解析

シストの形成から発芽に至るまでの発現遺伝子の変動を明らかにするため、シストに内在するクロロフィル量を指標とした各ステージのシストおよび栄養細胞を用いた RNA-seq 解析を実施した。その結果、栄養細胞とシストの休眠期(Stage B)における発現量に有意な差異が認められる遺伝子群が存在した(図2)。シストの休眠期(Stage B)では、光合成に関する光化学系 I および II の他、カルビンベンソン回路に関わる遺伝子群を筆頭に、解糖系やクエン酸回

路、DNA 複製など多くの生命活動に関わる遺伝子群の遺伝子発現が減少していた。一方、休眠期を過ぎるとそれら遺伝子発現が徐々に誘導され、発芽につながることを示唆された。次に各ステージにおける細胞内の代謝物をメタボローム解析を用いて同定した。その結果、栄養細胞に比べシスト形成直後 (Stage A) では脂肪酸含有量が減少すること、また、シストの形成および保存温度により糖質の含有量が異なる事等が明らかとなった。以上のように、*Alexandrium* 属はシストの形成から発芽までの間に、細胞内の遺伝子および代謝物を大きく変動させ、シストの発芽および増殖に向けて備えていることが明らかとなった。

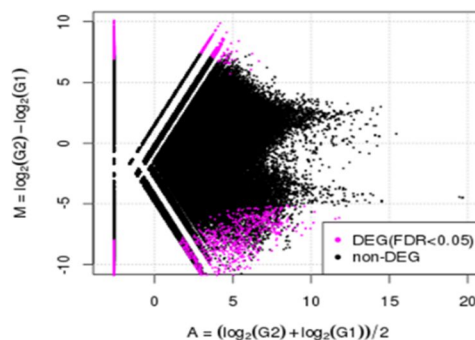


図2 栄養細胞およびシスト (Stage B) の遺伝子発現量比

### 2) シストの電位への応答解析

底質を含まない条件にてシストが接触しているガラス電極の電位操作を実施した結果、電位操作はシストの発芽に影響を及ぼさなかった。このことから、シストが直接的に電位を感知していないことが示唆された。

### 3) 底質中還元物質のシスト発芽への影響評価

底質中に含まれる酸化還元物質および電子伝達物質が発芽応答への影響をおよぼす可能性が示唆されたことから、底質電位が低く還元的な環境で発生する遊離硫化物の *Alexandrium* 属 (栄養細胞およびシスト) への影響を検討した。その結果、シストは栄養細胞に比べ遊離硫化物に対する感受性が低い傾向が認められたものの、遊離硫化物の曝露がシストの発芽を抑制することを確認した。

複数の遊離硫化物濃度区を設定し、シスト発芽への影響を詳細に検証した結果、高濃度 (1.0 mM) の遊離硫化物に 3 日間曝露することでシストは死滅すること、また、低濃度 (0.5 mM) の濃度では、曝露期間中はシスト内のクロロフィルの形成が抑えられ発芽が抑制されるものの、遊離硫化物を含まない清浄な海水へ移行した後は発芽が誘導されることが明らかとなった (図 4)。そこで、低濃度での曝露時における、シスト生体内因子の変動を明らかにするため、RNA-seq およびメタボローム解析を実施した。その結果、硫化物に曝露することでいくつかのストレス応答遺伝子の発現が増加する一方、RNA の修飾や解糖系など生体内の代謝に関与する遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。また、メタボローム解析の結果、核酸の構成等に関与する糖や基礎代謝に重要な一部の有機酸が増加する傾向が認められたことから、硫化物の毒性影響により代謝系が抑制されシストの発芽が抑制されることが示唆された。

以上のことから、*Alexandrium* 属のシストの発芽は、底質環境に大きく影響を受け、電位が低く、硫化物が発生する還元的な底質環境ではシストの発芽が抑制されることが示唆された。これは電位を指標として底質環境を管理することでシストの発芽 (赤潮発生の始発点) を操作できる可能性を示唆するものである。

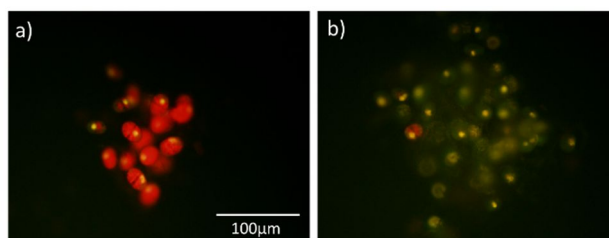


図3 遊離硫化物によるシストへの影響  
(a) 正常にクロロフィルが形成されたシスト  
(b) 遊離硫化物に曝露されクロロフィル形成が遅れたシスト

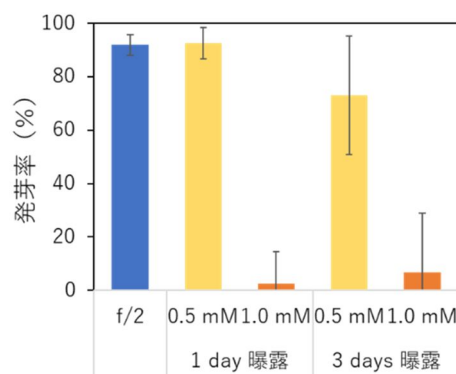


図4 遊離硫化物がシスト発芽へ及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	中村 龍平  (Nakamura Ryuhei)  (10447419)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー   (82401)	
研究分担者	羽野 健志  (Hano Takeshi)  (30621057)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員   (82708)	
研究分担者	坂本 節子  (Sakamoto Setsuko)  (40265723)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・グループ長   (82708)	

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