

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580222

研究課題名（和文） スケルトネマ属珪藻の分類の再検討と時空間分布

研究課題名（英文） A reexamination of the taxonomical study of the genus *Skeletonema* and their spatial and temporal distribution in Japan

研究代表者

石丸 隆 (ISHIMARU TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学部・教授

研究者番号：90114371

研究成果の概要（和文）：*Skeletonema* 属珪藻は世界中の沿岸域に広く分布するが、申請者らは形態観察と遺伝子解析より東京湾には 4 種が出現することを明らかにした (*S. dohrnii*, *S. japonicum*, *S. tropicum*, *S. j-d*)。本年度は、それら各種の水温および塩分に対する増殖特性を調査した。最も高い増殖速度であったのは *S. dohrnii* であり、広温・広塩性であった。*S. japonicum* は低温を好み、次に増殖速度が高かった。これらの生理学的特徴は、東京湾における分布傾向をよく反映していることも明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Marine diatom genus *Skeletonema* is widely distributed in coastal areas around the world. We showed that the four species to appear from gene analysis and morphological observation in Tokyo Bay (*S. dohrnii*, *S. japonicum*, *S. tropicum*, and *S. j-d*). For these species, the growth rate of various water temperature and salinity were measured. The highest growth rate was showed in *S. dohrnii*, and physiological characteristics were liked to be euryhaline and eurythermy. *S. japonicum* was late growth than previous specie, and prefer a low temperature. These physiological characteristics were well reflected their distribution in Tokyo Bay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	579,000	2,479,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,149,000	4,949,000

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：*Skeletonema* 属 海産珪藻 東京湾 増殖速度 出現種の経年変化

1. 研究開始当初の背景

Skeletonema 属は、世界中の沿岸河口域に見られる中心目珪藻であり、光合成を行う基礎生産者として海洋の生態系を考える上で非常に重要な種である。本属は、東京湾においてもっとも一般的に出現して赤潮を形成す

る種として知られており (Brandini and Aruga, 1983; 野村・吉田, 1997), 2010 年に報告された 18 件の赤潮のうち, 10 件が本属を第一優占種とするものであった (東京都環境局自然環境部, 2011)。

Skeletonema 属は、従来から光学顕微鏡を用

いた観察による連鎖の長さや葉緑体の数、また生態の違いから分類が可能とされ、いくつかの種が知られていた。しかしながら、いずれの種も円筒形の細胞と細胞が細長い突起で連結し、それらの細胞の直径は非常に小さいため、光学顕微鏡レベルでの差異を見分けるのは困難を極める。Mendin et al (1991)は、近年汎用されるようになった電子顕微鏡を使った観察と遺伝子解析を併用して、*S. costatum* と考えられてきたもの (*S. costatum sensu lato*, 以降は *S. costatum* s. l.) の中に異なる種を見つけたことを端緒に分類に関する再検討が行われ、現在では類似種が 8 種 (*S. ardens*, *S. costatum sensu stricto*, *S. dohrnii*, *S. grethae*, *S. grevillei*, *S. japonicum*, *S. marinoi*, *S. pseudocostatum*) 存在することが報告されている (例えば Sarno et al, 2005, 2007)。これらの成果によって、従来から知られていた種を合わせて、海産の *Skeletonema* 属は 11 種から構成されていることが明らかになった。

日本における *Skeletonema* 属各種の出現は、東京湾の他に洞海湾や瀬戸内海、大阪湾などで報告されている (Kooistra et al., 2008 ; Yamada et al., 2010)。東京湾において、*S. costatum* s. l. は頻繁に赤潮を形成し、申請者らはこれらが年間を通してしばしば最優占種となることが報告してきた (吉田ら, 2009) が、このような背景から、複数の種が季節ごとに出現している可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

S. costatum s. l. の再分類によって、*Skeletonema* 属の種ごとの生理・生態学的特性の再検討が必要になったものの、それらの研究の例は少ないのが現状である。また、植物プランクトンの消長は、栄養塩などの化学的要因や、照度や温度、塩分などの物理的要因が関わっている。東京湾は、世界的にも有名な富栄養化した海域であり、栄養塩が植物プランクトンの増殖への制限要因にはならないとされている (山口・柴田, 1979)。したがって、現場海域における消長を明らかにするため、水温や塩分条件による本属の増殖特性を調べることは重要である。そこで、本研究は、東京湾に出現した *Skeletonema* 属について、様々な温度と塩分条件の下で増殖特性を調べた。さらに、東京湾湾奥における細胞密度を調査して季節変化を明らかにし、種ごとの生理学的特性と海洋環境要因との関係について考察することを目的として行った。

3. 研究の方法

本研究に用いた試料は、研究補助者である川村 (2010) が形態観察および遺伝子解析により同定した *S. dohrnii*, *S. japonicum*, *S. tropicum*, *S. j-d* の各株を培養したものを供した。Sarno et al. (2005) は、*S. marinoi* と *S.*

dohrnii は殻帯の構造の違い、また遺伝子配列によって分けられるとし、川村 (2010) はそれに従って *S. dohrnii* を同定した。しかし、この 2 種の形態学的特徴は類似しており (Ellegaard et al., 2008)、また、rDNA 解析によっても区別出来ないとされている (山田ら, 2009a)。また、*S. j-d* は、形態学的特徴は *S. japonicum* に類似しているが、遺伝子解析では *S. dohrnii* と同定された種である。

これら株の維持培養は、温度 20°C、照度約 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12L : 12D で行った。培地は改変 T1 培地 を使用した。培地のベース海水は相模湾表層水を用い、ガラスフアイバーフィルター (GF/F, 直径 47mm, Whatman) でろ過した後に、MilliQ 水で塩分 30 に調整し、0.20 μm フィルター

(LABODISC, ADVANTEC) でろ過滅菌を行った。

実験は、照度約 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12L : 12D で行った。温度条件は 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C の 5 段階、塩分条件は 10, 15, 20, 25, 30, 35 の 6 段階に設定した。培地は、維持培養と同じく改変 T1 培地を使用し、容積 50mL の平底試験管に培地 30mL を入れ、初期細胞密度が約 1000 $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ になるように接種して実験に供した。なお、塩分 35 の培地は栄養素を添加する前に、乾燥器の中で水分を蒸発させ塩分を高めてから調整を行った。

増殖速度の測定は、各実験条件について 3 本ずつ行った。*in vivo* クロロフィル蛍光値の測定には、蛍光光度計 (TD-700, Turner Designs, USA) を使用した。測定はおよそ 1 日毎に 30 日間行い、増殖速度 μ_2 を以下の式から算出した。なお、 F_1 , F_2 は、培養 t_1 , t_2 日目の対数増殖期における *in vivo* クロロフィル蛍光値である。

$$\mu_2 = \frac{\log_2 F_2 - \log_2 F_1}{t_2 - t_1}$$

なお、実験に用いた培養株は、光、温度、塩分に馴致させるため、同じ条件で 2-3 継代培養したものを使用した。

東京湾における季節消長について調査するために、東京海洋大学実習艇「ひよどり」および練習船「青鷹丸」により 2006 年 1 月から 2010 年 12 月まで毎月 1 回、羽田沖定点 (35°30'N, 139°50'E) において海洋観測を行った。バケツを使い、表面海水を採取した。そのうち 1L を植物プランクトン用の試料として最終濃度 1% になるように中性ホルマリンを加えて固定・保存した。試料は沈殿濃縮を行い、その一部を Millipore フィルター (孔径 0.45 μm) 上にろ過捕集し (吸引圧 10 kPa 未満)、Milli-Q 水で脱塩処理を行った。このフィルターをデシケーター内で一晚乾燥後、試料台に貼り付け、Pt-Pd でイオンコーティングし、走査型電子顕微鏡 (HITACHI S-4000)

を用いて同定, 計数を行った. 水温・塩分は多項目水質センサー (AAQ1183 アレック電子社) を用いて測定した.

4. 研究成果

4 種の増殖速度 (μ_2) の温度と塩分の等値線を Fig.1 に示した.

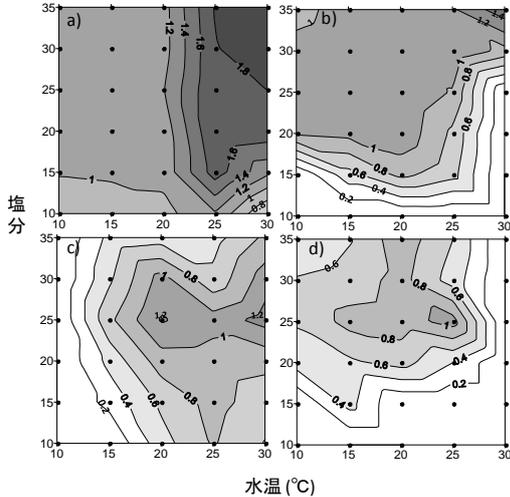


Fig. 1 *Skeletonema* 属 4 種の増殖速度 (μ_2) の等値線図. a) *S. dohrnii*, b) *S. japonicum*, c) *S. tropicum*, d) *S. j-d*.

S. dohrnii の最大増殖速度は 1.90 d^{-1} (30°C, 塩分 30, 35) であり, 4 種の中でもっとも高い増殖速度を示し, どの温度・塩分条件でも増殖が見られた. 増殖に対する好適範囲は, 10-35°C, 塩分 15-35 であり, 4 種の中でもっとも範囲が広がった. また, 特に高温・高塩分になるほどよく増殖する傾向が見られた.

S. japonicum の最大増殖速度は 1.53 d^{-1} (30°C, 塩分 35) であった. しかし, 30°C は塩分 10~25 では増殖せず, 塩分 10 ではどの温度条件でも増殖しなかった. 本種の好適範囲は, 10-20°C, 塩分 20-35 であり, 高温条件では高塩分で増殖する傾向が見られた.

S. tropicum の最大増殖速度は 1.28 d^{-1} (25°C, 塩分 25) だった. 10°C ではどの塩分条件でも増殖せず, 塩分 15 では 20-30°C で増殖したが 15°C では増殖しなかった. さらに, 20°C では 4 種の中で増殖速度がもっとも大きかった (1.16 d^{-1} , 塩分 25). 増殖に対する好適範囲は, 20-30°C, 塩分 20-30 であった.

S. j-d の最大増殖速度は 1.09 d^{-1} (25°C, 塩分 25) であり, 4 種の中でもっとも増殖速度が低かった. また, 10, 15, 25°C では, 塩分 25, 20°C では塩分 35 でそれぞれもっとも増殖速度が大きくなった. 好適範囲は, 25°C, 塩分 25 であり, 4 種の中で範囲がもっとも狭かった.

このように, 東京湾に出現する *Skeletonema* 属 4 種の増殖特性はそれぞれの種ごとに特徴

があり, 明確な違いがあることが示された. *S. dohrnii* は, 温度・塩分ともに広範囲の条件で安定して増殖し, 温度と塩分に対する耐性が高いということがわかった. Blazano et al. (2011) によると, *S. marinoi* は 15, 20°C では塩分 5-35 の範囲で増殖し, 広塩性を持つと報告した. また, Kaeriyama et al. (2011) は, *S. marinoi-dohrnii* complex が 10-30°C で増殖し, 30°C で最大増殖速度となったことを報告し, 本研究と同様の結果を得た. *S. japonicum* は, 好適温度が 10-20°C と低く, 寒冷性の種であると考えられた. 10°C 以下でも増殖できる可能性がある. *S. tropicum* は, 10°C ではどの塩分条件でも増殖しなかった. これは, 山田ら(2009 b)が, 本種は温度 12°C 以下では生存できないとした報告と一致した. また, 各温度条件における最大増殖速度は塩分 25 となり, Blazano et al. (2011) の報告ともほぼ一致した. これらのことから, *S. tropicum* は, 中程度の塩分を好む温暖種であると考えられた.

S. j-d は, 30°C ではどの塩分条件でも増殖せず, 好適温度は 25°C と限定的であったため温度への耐性が低いと考えられた. また, 塩分 10 ではどの温度条件でも増殖せず, 好適塩分も 25 のみと範囲が狭いことから, 塩分に対する耐性も低いと考えられる. 本種の増殖特性は, 形態的特徴が類似した *S. japonicum*, 遺伝子配列が類似した *S. dohrnii* の 2 種で比べてみると, *S. japonicum* の持つ高温と低塩分への耐性と一致した. つまり, 増殖特性は *S. japonicum* 型を示さない結果となったが, 研究補助者の報告では (松本, 2011), 光捕集色素である Chlorophyll *a* や Chlorophyll *c2*, Fucoxanthin の変動パターンは *S. japonicum* に似ているが, 光防御機構の性質は *S. dohrnii* と類似していたことを示し, さらなる生理学的な検証が必要である.

これら 4 種の増殖特性を比べると, 温帯域でもっとも広く分布が可能であると考えられたのは *S. dohrnii* であった. また, 10°C などの低温下では *S. japonicum* が卓越し, 水温 20°C, 塩分 25 程度の海域では *S. tropicum* が卓越することが示された. *S. j-d* は 4 種の中でもっとも増殖能力が低く, 出現が確認されたとしても卓越するには至らないと考えられた.

2006 年から 2011 年にかけて東京湾羽田沖定点の *Skeletonema* 属の季節消長を研究補助者の曾根原が報告した(曾根原 2012, Fig. 2).

S. dohrnii は季節を問わず出現し, 特に 3 月から 6 月にかけて出現しやすい傾向があった. また, *S. japonicum* は観測期間中に第一優占種となった月が多い種 (19 回) であり, 7 月と 8 月を除く月で出現し, 特に冬季に細胞密度が高くなったと報告した. しかし, *S. dohrnii* は *S. japonicum* に比べて細胞の結合が弱く,

離れやすい傾向にあるため、本種の同定は本
法では難しい。

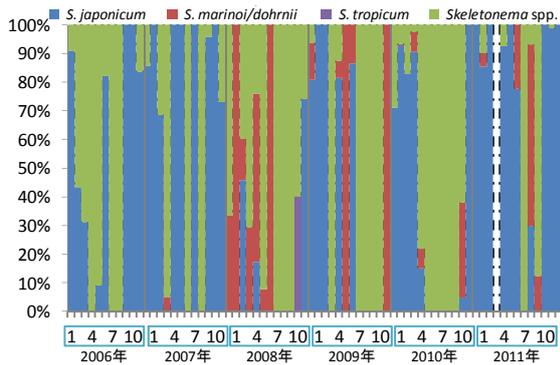


Fig. 2 東京湾羽田沖における *Skeletonema*
属各種の出現割合 (2006~2011年) .

このように、東京湾における *Skeletonema*
属は、夏季は主に *S. dohrnii* が出現し、冬季は
S. japonicum が出現する傾向が伺えた。培養
実験による生理学的特性は、*S. dohrnii* は広
温・広塩性を示したが、*S. japonicum* は寒冷
を好み、低温下では *S. dohrnii* より卓越する特
徴が示され、分布生態とよく一致した。また、
S. japonicum は高温では生存できる塩分範囲
が狭く、*S. dohrnii* より増殖速度が劣っていた。
また、本種は弱光条件に適応した種で、強光
下では *S. dohrnii* の増殖速度の方が高いとい
う報告もある(松本, 2011)。このように、夏季
の東京湾では *S. japonicum* は生存できず、*S.*
dohrnii が卓越すると考えられた。

S. tropicum は曾根原 (2012) によると、2008
年の 10 月にのみ出現し、常時は東京湾には
分布せず、湾外から運ばれた可能性が考えら
れる種と報告された。*S. tropicum* は、10℃で
はどの塩分条件でも増殖しなかったことより、
冬季の東京湾では生存できない。また、
S. tropicum は低温下で休眠期細胞を形成し、
その発芽には水温と光強度が関係している
との報告がある (山田ら, 2009a)。本種の東京
湾における消長を考えると、冬季には栄養細
胞は生存できず、休眠期細胞を形成しても発
芽に必要な光強度が足りないため、定着でき
ないと考えた。

S. j-d は、川村 (2010) が形態観察を行っ
た 116 株のうち、2009 年の 2, 6 月にしか得
ることができなかった稀有な種である。本種
の増殖特性は *S. japonicum* に類似しているこ
とより、現場海域における出現パターンも重
なると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 曾根原裕介、石丸隆、堀本奈穂 東京湾羽田
沖における植物プランクトンの季節変動、
2011 年度日本ベントス学会・日本プランク
トン学会合同大会 2011 年 9 月高知大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 隆 (ISHIMARU TAKASHI)
東京海洋大学・海洋科学部・教授
研究者番号：90114371

(2) 研究分担者

小池一彦 (KOIKE KAZUHIKO)
広島大学・生物圏科学研究科・准教授
研究者番号：30265722

堀本奈穂 (HORIMOTO NAHO)
東京海洋大学・海洋科学部・助授
研究者番号：90345405