

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02268

研究課題名（和文）魚貝類を斃死させる神経性毒プレトキシン保有藻の発生・毒産生機序の包括的解明

研究課題名（英文）Study on toxic bloom dynamics of the marine dinoflagellate possessing brevetoxins

研究代表者

山口 晴生（Yamaguchi, Haruo）

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授

研究者番号：10432816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：水産業の場として重要な沿岸域においては、有毒な微細藻の発生に伴う魚貝類の毒化事例があとを絶たない。そのような状況の下、本邦沿岸域にて神経性毒を保有しうる微細藻カレニア・パピリオネイシアが新たに見出された。そこで本研究課題では、安全な魚貝類の生産体制を構築すべく、当該藻の毒産生・発生機序を包括的に解明しようとした。本研究の遂行により、カレニア・パピリオネイシア等に由来する神経性毒“プレトキシン類”の検出・定量系を整えるとともに、同藻の発生機構を新構築した。以上により、沿岸生物生産の持続的発展に貢献する新しい知見・ノウハウを整備できたと判断される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在わが国では、公衆衛生の観点から、魚貝類を毒化させる有毒藻各種が厳重な監視下にある。その一方で、神経性毒の一種“プレトキシン”を産生する有毒藻については監視可能な体制が整っていない。このような状況に鑑み、本研究課題では、有毒藻カレニア・パピリオネイシアに由来するプレトキシン類の検出・定量系を確立するとともに、同種の大発生メカニズムを解明することで、現状における海洋生物のプレトキシン毒化リスクをおよそ評価できた。これらの知見・ノウハウは、わが国における水産資源の安全確保に貢献することから、学術的かつ社会的に重要な意義を有すると判断される。

研究成果の概要（英文）：Toxic algal blooms in coastal waters sometimes cause neurotoxic shellfish poisoning and have negative effects on human health. In Japan, blooms of *Karenia papilionacea* that putatively possesses neurotoxins have been reported recently. However, little is known about toxic bloom dynamics of *K. papilionacea*. This study developed the quantitative assays of *K. papilionacea* neurotoxins and further proposed the toxic bloom dynamics in coastal waters. Because *K. papilionacea* is able to grow rapidly at a high temperature and thus form blooms during the summer in Japan. We believe that these findings contribute to sustainable fisheries development.

研究分野：水圏微生物生態学

キーワード：カレニア・パピリオネイシア プレトキシン 神経性毒 増殖 発生機構

1. 研究開始当初の背景

里海となる沿岸域では、細胞内で毒を合成する有毒微細藻(有毒藻)が増殖し、それらの生物毒が食物連鎖を通じて、しばしば魚貝類の毒化ひいては喫食者(ヒト)の食中毒を引き起こす。将来にわたって安全な水産資源を持続的に生産するためには、有毒藻の毒生産と共に大発生へと至る機構を理解し、それに基づいた諸対策を図ることが重要である。

これを受けて日本では、麻痺性中毒・下痢性中毒を引き起こす有毒藻が重要視されており、それらの分布・現存量の推移が水産試験場などで重点的に監視されている。一方、神経性毒の一種“プレベトキシン”を保有する有毒藻については注目されていない。

現在、米国においては該当の有毒藻(*Karenia brevis*: カレニア・プレビス)が分布しており、モニタリングの重要監視対象になっている。しかし、日本をふくめた多くの国では、プレベトキシンを産生する有毒藻が近年まで確認されておらず、同毒の監視体制は構築されていない。

このような状況において申請者は、本邦沿岸域での調査を通じて、渦鞭毛藻カレニア・パピリオネシア(*Karenia papilionacea*) (図1)が広域にわたって分布していることを突きとめ、Yamaguchi et al. (2016)を通じて公表するに至った。その直前、Fowler et al. (2015)は、米国で見つかった*K. papilionacea* 培養株からプレベトキシン類を検出することに成功し、本種を「新たなプレベトキシン産生種」として扱うよう主張した。



図1 *Karenia papilionacea* の顕微鏡観察像。

わが国では、*K. papilionacea* の大増殖現象(いわゆる赤潮)が西日本各地で頻発しており、ごく最近では、東日本の沿岸域でも本種の赤潮が確認されている。国外に目を向けると、ニュージーランド近海の海水1リットルから数千以上の*K. papilionacea* 細胞が検出され、その際、魚類の斃死も認められている。

以上を踏まえると、わが国を含めた諸国の沿岸域において*K. papilionacea* が頻発していることに疑う余地はない。本藻の広域分布・高密度発生に伴い、水産資源として重要な魚貝類が潜在的な斃死・毒化リスクにさらされていることが示唆される(図2)。このリスクを把握するとともに対策を図る一環として、*K. papilionacea* の監視体制を構築することは極めて重要である。

2. 研究の目的

そこで本課題では、申請者が独自に確立した本邦産プレベトキシン様毒保有微細藻、すなわち有毒*K. papilionacea* の培養株をモデル材料として、その大発生に至る機序を毒産生機序と関連づけて解明する。これにより、*K. papilionacea* の発生およびそれに伴う魚貝類の斃死・毒化リスクを合理的かつ包括的に説明可能な新機構の提示を果たす。この目的を達成するため、本藻の毒性について試験するとともに、精緻な培養試験・東海解析を通じて大発生に関わる環境因子の影響について解析しようとした。

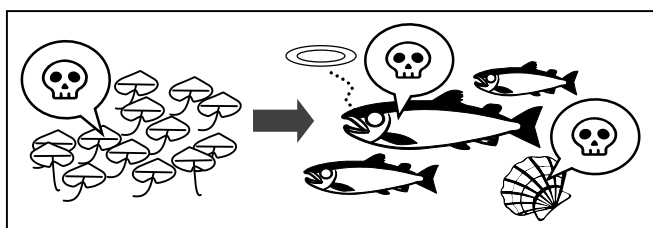


図2 *Karenia papilionacea* の発生に伴って神経性毒(ドクロ)が食物連鎖を通じて魚貝類を毒化・斃死させる潜在的リスク。

3. 研究の方法

(1) 毒産生に関して

本邦各海域から得られた*K. papilionacea* 分離培養株のプレベトキシンの保有状況を調べた。ここでは、レセプター反応に基づく簡易・迅速アッセイ系を導入することで、多数にのぼる分離株の毒生産力を効率よく評価しようとした。また、当該毒の監視体制を構築することも視野に入れ、LC/MSの機器分析により、既知プレベトキシンを定量的に検出可能な系を整備した。

(2) 大増殖に至る機序について

沿岸海域で観察される様々な水温・塩分条件下にて *K. papilionacea* 無菌株を培養した。各条件下で算定した増殖速度を比較することで、増殖に及ぼす水温・塩分の影響を調べた。ここでは Yoshimatsu et al. (2014) で培われた微細藻の培養最適化手法および増殖評価手法を活用することで、効率よく実験を進めようとした。さらに、沿岸域で観察される光照射環境等を近似再現可能な装置“アクアトロン”を開発し、それを用いて *K. papilionacea* 株を培養し、同藻の鉛直的な動態を時系列で解析した。

4. 研究成果

(1) 毒産生に関して

本研究を通じて、本邦産 *K. papilionacea* のプレベトキシン類に由来する毒性が検出された。毒の主体はプレベトキシン-2b と推察されるが、陽性試料に用いた *K. brevis* に比べて毒性そのものは弱いようである。先に述べた *K. brevis* は、リンで増殖が制限されると、その毒性を増大する傾向にある。一方、本邦産 *K. papilionacea* の毒性については、リンあるいは窒素による増殖制限下であっても変動しなかった。今後、培養条件間ならびに株間における毒産生能の差異を検討すべきであろう。

毒保有藻からターゲットの毒を効率よく抽出可能な手法について検討を重ね、多種多様なプレベトキシン類の構成化合物を定量的に検出可能な機器分析系を確立した。また、神経細胞を用いたニューロアッセイにより、培養株のプレベトキシンに由来する毒性の有無をおよそ評価することが可能となった。神経系に作用する毒が多岐にわたることを考慮すると、当該アッセイ系は、*K. papilionacea* あるいは *K. brevis* に由来するプレベトキシン類を簡易にスクリーニング可能な手法として有用であろうと考えられる。

(2) 大増殖に至る機序について

海水と培地成分の最適な組み合わせにより、*K. papilionacea* を良好に培養することが可能となった。これを受けて、いくつかの水温・塩分条件に対する同藻培養株の増殖応答を調べた結果、試験藻は水温 25~30°C と塩分 30~35 の組み合わせ条件下において最もスピーディーに増殖可能なことが明らかとなった(図3)。一方で、わが国沿岸の晩秋~冬季にみられる水温 15°C 以下の条件では増殖が認められなかった。これらのことから、*K. papilionacea* は高水温期の到来にあわせて活発に増殖し、水温 25~30°C に達する盛夏において高密度に増殖するものと推察される。

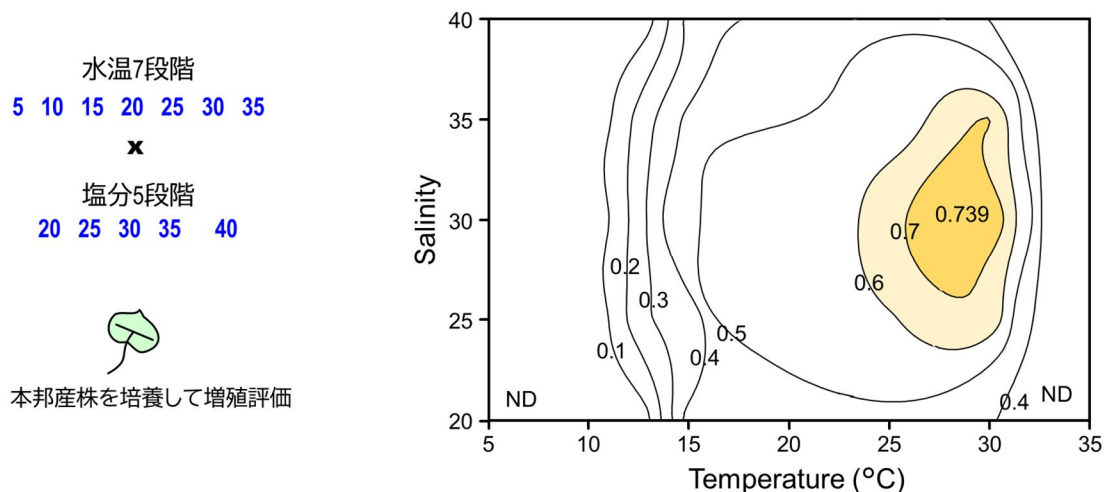


図3 水温・塩分条件下における *Karenia papilionacea* の増殖速度(右)ならびに培養実験の概要(左)。増殖速度(divisions/day)は等高線で示されており、検出されないケースでは ND (Not detectable) で示されている(右)。

本藻の増殖速度に対して水温・塩分が相互に作用することが示唆された。そこで、水温(T)、塩分(S)および両者相互因子(TS)が変数となる増殖速度の重回帰分析を実施した結果、以下の回帰式が得られた:

増殖速度(divisions/day)

$$= -0.04715T + 0.006667T^2 - 0.00013T^3 + 0.04160S - 0.000025S^3 - 0.00004T^2S + 0.00003TS^2 - 0.83553 \quad (1)$$

この式は重相関係数 0.9 以上かつ統計学的に有意($P < 0.01$)なものであった。よって、本藻の増殖速度を水温と塩分に基づいて高精度に予測(回帰)可能と判断される。

これに先行するかたちで、光強度 (L) を変数とした増殖回帰式 $f(L)$ も得ることができた。ここで、海域の光強度は次の 3 因子、すなわち海面の光強度 (L_0)、透過光の減衰係数 (k)、ならびに深度 (z) で定まることを踏まえ、次の関係式が導かれる：

$$\text{増殖速度} = f(L) = f(L_0, k, z) \quad (2)$$

この 3 因子で決定される増殖速度モデルにしたがうと、海面の光強度が低い曇天時あるいは濁度が高い状況では、適量の光が得られる表層付近で *K. papilionacea* は活発に増殖可能と目される。一方、晴天時かつ清浄な海洋環境では、ごく表層の強光を避けるようにして、亜表層以深を増殖の場とする。ただし、沿岸海域における光の変動は目まぐるしく、それに応じた細胞個体の応答はまちまちであろうことから、我々の目には、これら細胞群が表層から亜表層まで幅広い層に分布しているように見えるかもしれない。

このことを予備的に検証すべく、海面に降りそそぐ弱光～強光照射ならびに水塊の成層構造といった沿岸域の環境を(室内に居ながらにして)近似再現可能な装置“アクアトロン”を開発した。これを用いて *K. papilionacea* を培養したところ、多くの細胞群が表層から亜表層に至る有光層広域に分布することが捉えられた。試験結果の再現性を検証する必要があるとはいえ、天然の沿岸環境さながらの状況にて *K. papilionacea* の鉛直挙動を時系列で示せたことは、同藻はもちろん、植物プランクトンの発生機構全容を解明するための足掛かりとして重要な位置づけにある。

(3) 有毒ブルームの発生に至る機構

以上を踏まえ、本邦沿岸海域における *K. papilionacea* の有毒ブルーム発生に至る機構を考察した(図 4)。この機構にしたがうと、低水温耐性を有しない *K. papilionacea* にとってブルームを形成できる時期は水温 15°C 前後の春季；それ以降の水温上昇に伴って *K. papilionacea* はよりスピーディーに増殖していく。ただし梅雨に見舞われる時期、水温は 20～25°C 前後で推移しながらも、増殖の場となる有光層の塩分は極端に低下、さらに日照も低下することが頻発するため、*K. papilionacea* は十分なポテンシャルを安定して発揮できないと予想される。そのような状況では、低塩分でも増殖可能な同属 *K. mikimotoi* が *K. papilionacea* を生態学的に卓越しやすい。しかし、日照り続きの盛夏が到来すると、30°C のような極めて高水温環境において *K. papilionacea* は増殖ポテンシャルを発揮し、有毒ブルームを形成するものと推察される。夏の終わりには、水温の低下に伴ってポテンシャルは低下、個体群サイズを縮小しながら越冬に向かう。水温 10°C では生存することが難しいため、個体群の大半は死滅する可能性が考えられる。

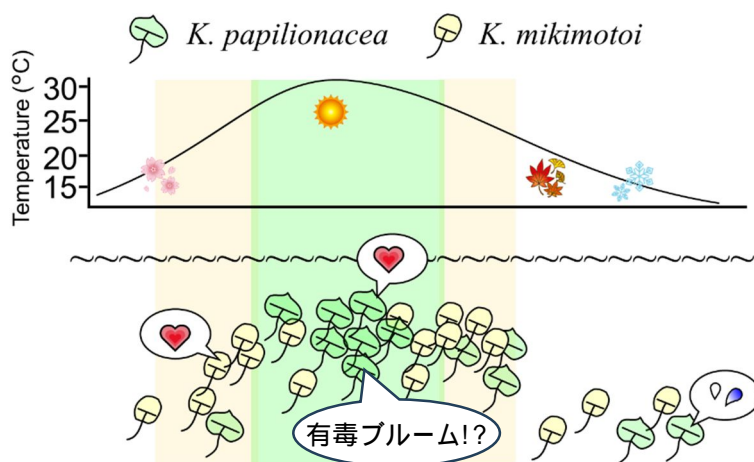


図 4 増殖および毒産生特性に基づいた *Karenia papilionacea* 有毒ブルームの季節変動。分布域を共にする同属 *Karenia mikimotoi* との比較。

以上、本研究を通じて、本邦沿岸域におけるプレベトキシン類を監視可能な基盤 　すなわち、プレベトキシンを産生しながら *K. papilionacea* がブルームに至る機構を新構築することができた。これまでの知見により、*K. papilionacea* が同属 *K. mikimotoi* と分布域を共にしていることは明確であり、両種は競合関係にある可能性がある。その点も考慮すると、西日本の広域にわたって分布し、水温 10°C でも増殖可能な *K. mikimotoi* は、*K. papilionacea* よりも比較的早期にブルームを形成するのかもしれない。それに対して、*K. papilionacea* がブルームを形成できるのは暑さの厳しい盛夏の可能性がある。ただし、本藻は決して高い毒産生能を有していないため、たとえ赤潮を引き起こしても、たちまち水産魚介類を毒化させるとは考えにくい。おそらく濃密なブ

ルームを長期にわたって形成した時に、水産資源の毒化をもたらすかもしれない。これらのことは、水産環境の保全ならびに安全な水産資源を安定供給する上で、極めて重要な知見であると言える。

引用文献

- Fowler N, Tomas C, Baden D, Campbell L, Bourdelais A. Chemical analysis of *Karenia papilionacea*. *Toxicon* 101, 85–91, 2015.
- Yamaguchi H, Hirano T, Yoshimatsu T, Tanimoto Y, Matsumoto T, Suzuki S, Hayashi Y, Urabe A, Miyamura K, Sakamoto S, Yamaguchi M, Tomaru Y. Occurrence of *Karenia papilionacea* (Dinophyceae) and its novel sister phylotype in Japanese coastal waters. *Harmful Algae* 57, 59–68, 2016.
- Yoshimatsu T, Yamaguchi H, Iwamoto H, Nishimura T, Adachi M. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae). *Harmful Algae* 35, 29–37, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口晴生, 三門哲也, 足立真佐雄
2. 発表標題 渦鞭毛藻Karenia属の発生に及ぼす水温・塩分の影響
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruo Yamaguchi, Testuya Mikado, Masao Adachi
2. 発表標題 Effects of temperature and salinity on growth of Karenia mikimotoi and Karenia papilionacea cultures
3. 学会等名 International Conference on Harmful Algae (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>水族環境学研究室（水質汚濁，赤潮，魚毒性中毒・貝毒，バイオ燃料） http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html インスタグラム：海のナントカ研究室がゆく https://www.instagram.com/kochi_yamaguchiken/?hl=ja</p>

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	鈴木 敏之 (Suzuki Toshiyuki) (70371804)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(長崎)・部門長 (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
---------	---------