

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580285

研究課題名(和文) 海産生物における記憶喪失性貝毒の生産・動態に関する研究

研究課題名(英文) A study on ASP toxin production and dynamics in toxin producing organisms

研究代表者

小瀧 裕一 (Kotaki, Yuichi)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：30113278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：記憶喪失性貝毒生産藻3種に関して、分布、毒生産特性、毒の動態を検討した。Pseudo-nitzschia multiseriesを分離したが早めに死滅し、追及は困難であった。Nitzschia navis-varingicalは南方産でわが国まで黒潮で運ばれて分布を拡大したとの仮説を構築した。同種の増殖・毒生産特性、rDNA ITS領域の塩基配列比較結果は上記仮説を支持した。同種は、ドゥモイ酸とイソドゥモイ酸A、Bを生産し、その組み合わせから4タイプに分けられるが、それを制御する因子は遺伝子および環境細菌の存在であった。毒生産に及ぼす細菌の影響はP. multiseriesが最も顕著であった。

研究成果の概要(英文)：Distribution, ASP toxin production characteristics and the dynamics of these toxins were surveyed for the toxin producing diatom, Pseudo-nitzschia multiseries, Nitzschia navis-varingica and red alga Chondria armata. It was hypothesized that N. navis-varingica is a tropical species and expanded its distribution to eastern Japan along the warm water current "Kuroshio" which flows from the east coast of the Philippines to Japan. The characteristics of growth and the geographical comparison in the toxin profiles and genetic markers in N. navis-varingica strains along the "Kuroshio" supported the above hypothesis. N. navis-varingica shows the toxin profiles composed of domoic acid and isodomoic acids A and B. Factors controlling the toxin profiles were searched, resulting in finding the important roles of genetic difference and environmental bacteria. Bacterial effect on the toxin production seemed to be the most obvious in P. multiseries culture than in other organisms cultures.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：記憶喪失性貝毒 ドゥモイ酸 イソドゥモイ酸 Pseudo-nitzschia Nitzschia navis-varingica ハナヤナギ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) カナダにおいて 1087 年に発生した記憶喪失性貝中毒 (ASP) の原因毒はドウモイ酸 (DA) で、その原因生物は珪藻の *Pseudo-nitzschia multiseriis* と判明した。同種はわが国にも常在し、ホタテガイやムラサキガイを弱いながら毒化させることが、大船渡湾の調査で明らかになった。他の *Pseudo-nitzschia* の毒生産もその後確認されたが、*P. multiseriis* の生産能が最も高く、筆者らを含めた研究者らにより同種による毒生産機構が検討されていた。筆者らは特に同種の DA 生産に及ぼす細菌の影響に注目して検討を進めていた。

(2) 近年筆者らは、ベトナムの汽水域で高度な DA 生産能を示す *Nitzschia navis-varingica* を見出した。同種は、現在まで高度な DA 生産能が報告された *Pseudo-nitzschia* 以外の唯一の珪藻で、これまでベトナム、フィリピン、タイ、インドネシアなど東南アジア各国の汽水域およびわが国の沖縄、東日本太平洋沿岸など熱帯、亜熱帯、温帯と比較的広い地域の特定の汽水域に分布することが分かった。同種はまたこれまで *P. multiseriis* などで確認されてきた主成分の DA に加えて異性体のイソドウモイ酸 A (IA) および B (IB) も主成分として生産し、その毒生産タイプは DA-IB、IA-IB、IB、DA-IA-IB の 4 タイプに分けられることが分かってきた。これらの毒組成を制御する要因・機構を調べることは、同種の毒生産過程・機構解明につながると考えられた。

(3) 紅藻ハナヤナギ *Chondria armata* は ASP 毒を極めて高度に生産することで知られている。同種 ASP 毒中約 80% が DA で残りの 20% 中に IA、IB、5'-epi-DA (Epi) などの異性体が含まれる。同種の毒生産機構を解明する一環として、同種藻体自身による毒生産の確認と同藻の毒生産に及ぼす細菌の役割を、*P. multiseriis* や *N. navis-varingica* と比較しながら進めることは、ASP 毒の生産および生理・生態学的に重要と考えられた。

(4) 上記 3 種以外でも ASP 毒生産能の検索を行うことは、同種の生態学的な役割および毒生産機構を検討する上で意義あることと考えられた。

(5) ASP 毒の毒性は DA、Epi が最も高く IA、IB の順に低くなる。貝体内で毒の構造変換などにより毒組成が変わると貝の毒性も変化することになる。従って貝類中の ASP 毒の動態および毒組成の変化に関して検討することは、食品衛生的な観点から重要と考えられた。

(6) 本研究の実行初年度 3 月に東日本大震災が発生した。(1) および (2) の珪藻が

分布するフィールドも津波や地盤沈下により大きく変化した。その後の上記珪藻の消長を調べることは、食品衛生および生態学の観点から重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) *P. multiseriis* の記憶喪失性貝毒生産は環境細菌の影響を強く受けることがこれまでの研究で分かっている。本研究では細菌の影響が、直接的なものであるか何らかの化合物を介するものであるかを検討する。

(2) *N. navis-varingica* の記憶喪失性貝毒組成には DA-IB、IA-IB、DA-IA-IB、IB の 4 つのタイプがあることが、これまでの研究で明らかになってきた。本研究では、これらの毒組成を制御する因子を明らかにすることにより、同種の毒生産機構を検討する。また、同種の毒生産における各成分の生産順序についても検討する。

(3) 極めて高度な ASP 毒生産能を示す紅藻ハナヤナギに関しては、その培養株を確立、無菌化を行った後その毒生産能や毒組成を調べ、毒生産に関与する細菌の役割を明らかにすることにより、毒生産機構および毒生産の生理・生態学的な役割を考察する。

(4) 上記 3 種以外の微細藻に関してもその ASP 毒生産能の検索を行い、生態系における ASP 毒生産藻の位置を明らかにする。

(5) ASP 毒生産珪藻を摂食することにより毒化する貝類中での毒の分解を含む構造変換の可能性を調べるとともに、DA 以外に IA や IB も生産する *N. navis-varingica* を摂食して毒化する貝類の検索とその毒組成を調べ、生態系における *N. navis-varingica* ASP 毒汚染のポテンシャルを予測する。

(6) 2011 年 3 月の東日本大震災の津波や地盤沈下後の *P. multiseriis* および *N. navis-varingica* の出現を、これまで確認していた海域 (*P. multiseriis*; 大船渡湾、越喜来湾、*N. navis-varingica*; 岩手県大槌湾～千葉県市原に至る太平洋沿岸河口域) でモニターし、出現した場合はその毒生産能を調べて同地域の ASP ポテンシャルを推定するとともに、上記珪藻の毒生産に及ぼす震災の影響を考察する。

## 3. 研究の方法

(1) 保存中に死滅してしまった *P. multiseriis* を新たに大船渡湾・越喜来湾から分離して培養株を作製した。さらに *P. multiseriis* の無菌培養株を確立し、それを用いた透析膜実験の再現性を確認後、DA 生産に関与する化合物の分子量の範囲の検討を目指した。(5) とリンクさせながら実施した。

(2) *N. navis-varingica* の毒生産タイプとアジアにおける同種の分布について、海流および同種の rDNA ITS 領域の塩基配列類似性を考慮に入れて考察した。すなわち、毒組成のタイプと遺伝子の関係を検討した。同一組成タイプの各成分の割合は、温度、光照射強度、pH、塩分濃度等の物理的要因および環境細菌との関係から培養実験で検討した。また、珪藻による DA、IA、IB の毒生産の順位を特定するために、DA-IA-IB タイプの株を用いたタイムコース培養実験を行った。

(3) 紅藻ハナヤナギの生細胞（できれば孢子）から新たに生長した細胞を確立し、その毒性と毒組成を調べた。また、新たに生長した細胞培養は抗生物質で静菌したのちその毒生産を調べ、静菌前と比較した。

(4) これまで予備的に DA の生産能が疑われた渦鞭毛藻の *Alexandrium tamarense* および *Prorocentrum lima* に加えて、共同研究者らから送られたチュニジア産新種珪藻 *Nitzschia bizertensis* に関して、種々の条件の培養実験で ASP 毒生産の化学的な証明を試みた。

(5) ホタテガイへの ASP 毒投与実験に加えて、貝可食部から粗酵素液を調製し、それを用いて毒添加インキュベート実験を行った。使用した魚介類は、17 種 27 検体の貝類と 4 種 8 検体の魚類である。また、基質毒として DA、IA、IB を用いた。

フィリピン・ルソン島中部の *N. navis-varingica* 分布地に生息する二枚貝および巻貝の ASP 毒含有量を HPLC-UV 法で調べた。

(6) 東日本大震災後の大船渡湾、越喜来湾の定点でプランクトンネット試料を採集し、その ASP 毒定量を行うとともに羽状目珪藻を分離して培養実験でその毒性を調べた。*P. multiseriis* ならばはっきりと毒性が検出されるはずである。同時に両湾に垂下したホタテガイとムラサキイガイを採集し、その毒性を定量した。また、*N. navis-varingica* に関しては、以前に分布を確認した東日本沿岸河口域において小プランクトンネットで採集を行い、粗培養の後分離、さらに培養実験でその毒生産能を確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 震災後平成 23 年夏から岩手県大船渡湾および越喜来湾でプランクトンネット試料を採集し、培養実験で *P. multiseriis* の検索を実施した結果、平成 25 年 10 月の大船渡湾試料から 3 株同種の分離に成功した。培養実験でその毒性を調べたが、約 3 週間で死滅してしまい毒性は  $0.64 \pm 0.38 \text{ pg/cell}$  ( $n=3$ ) と低い値を示した。その後同じ培養実験を繰

り返したが、やはり 3 週間で死滅し同様の結果になった。同種の毒生産特性として、培養 3 週間で降の栄養塩が枯渇した時期に急激に DA 生産能が上昇することが分かっており、培養 3 週目で死滅したことが今回の低い毒性の原因と考えられる。また、ある種の環境細菌が毒生産能を上昇させることがこれまで分かっているが、今回の結果が震災の影響で細菌叢が変わったせいなのか新たに分離された株の遺伝的性質なのかについては不明である。同種を分離できたのが本研究の最終年度後半であったことおよび弱いタイプの培養株であったことから、当初計画した無菌培養株作製後の諸実験は、未了に終わった。

(2) *N. navis-varingica* の毒組成タイプは、DA-IB タイプがメジャーで IA-IB や IB のみのタイプはフィリピン・ルソン島中部～北部西岸河口域を中心に分布し、他の地域にはほとんど見られなかった。この結果をフィリピン東岸からわが国に向かって北上する黒潮などの暖流を考慮に入れて考察すると、同種は南方性で、大雨で河口域から外洋に流されフィリピン東岸から黒潮に乗ってわが国までその分布を拡大してきたという仮説が導かれた。わが国の東岸で見つかる同種は常に日当たりが良くまわりより水温の高い地点に分布すること、温度別培養実験で高温ほどその増殖および毒生産能が高いこと、塩分濃度 7-35‰ の広い範囲で増殖可能なこと、rDNA ITS 領域の塩基配列を黒潮に沿った地域の同種間で比較すると分布距離が遠くても類似していること、黒潮沿岸でこれまで未確認だった地域（三重、和歌山、台湾西岸）および黒潮から分岐した対馬暖流沿岸（長崎、佐賀、福岡、山口）でもその分布が確認されたことなどの結果はすべて上記の仮説を支持する（投稿準備中）。

また、毒組成のタイプの違いと rDNA ITS 領域の塩基配列を比較すると、特殊な IA-IB や IB タイプと DA-IB タイプでは違いが見られた。すなわち毒組成のタイプの違いは遺伝子の違いによることが示唆された。

同種の無菌培養株を作製して毒生産を観察したところ、DA が減少して IA が増加した。また無菌培養の培地画分を有菌培養のそれで置換すると、DA が増加し IA が減少、毒組成は有菌親株のそれに戻った。すなわち環境細菌もまた毒組成タイプ制御にある程度関与すると考えられた（投稿準備中）。

同一の毒組成内部での各毒の割合に影響を与える要因として、培養温度、pH、塩分濃度などを変えて培養実験を行ったが、再現性のある結果がなかなか得られず、現在も続行中である。

DA-IA-IB を生産する株を用いてタイムコース培養実験を行ったところ、IA が先に出現してくる場合と全部の成分が同時に出現してくる結果の 2 通りが得られた。今後さらに検討が必要である。

(3) 紅藻ハナヤナギに関しては、孢子からの培養株の確立を目指したが、不調であったことから、今回は f/2 倍地中の生体から新たに生長した細胞を用いてその毒性を親生体と比較した。その結果毒生産能、組成とも親生体とほぼ同じであった。また、これらの細胞を抗生物質処理して限りなく無菌に近い状態にした後毒の分析を行ったところ、毒の生産能は親生体よりやや低かったが、毒組成はほぼ同じ結果が得られた。毒生産に及ぼす細菌の影響はさほど顕著でないと考えられた。

(4) 今回の培養条件では、渦鞭毛藻の *A. tamarense* および *P. lima* に関しては、ASP 毒生産能を確認することはできなかったが、*N. bizertensis* に関しては、1 細胞あたり DA ( $2 \times 10^{-1}$  fg)、IA ( $5 \times 10^{-2}$  fg)、IB ( $2 \times 10^{-2}$  fg) と弱いながらも HPLC-FMOC 法で確認することができた。

(5) ホタテガイ生体へ DA、IA、IB 標準毒を投与してその体内での挙動を調べたが、ホタテガイは短時間で死亡してしまい、はっきりした結果は得られなかった。次に標準毒を大量に必要としない方法として、各魚貝類の粗酵素液を調製しそれに DA-IA-IB の混合標準毒を加えてインキュベート実験を行った。その結果、すべての検体で毒は少し減少したが、劇的に別の成分に構造変換したりなくなったりすることはなかった。すなわち、この結果が *in vivo* でも適応できるとすると魚貝体内で低毒性のイソドウモイ酸 A や B が構造変換して高毒性の DA になる可能性は低いと考えられるが、さらに継続的な検討が必要である。

*N. navis-varingica* 生息地の二枚貝および巻貝 10 種 58 検体の ASP 毒を分析したところ、巻貝 *Vittina* sp. (5 個体合) に 1.6  $\mu$ g/g、シジミ科二枚貝の *Polymesoda erosa* 3 個体に 0.2、0.2、9.3  $\mu$ g/g の DA が検出され、低濃度ながら *N. navis-varingica* により貝類が毒化することが確認された。異性体は検出されなかった (投稿準備中)。

(6) 震災以前に *P. multiseriis* の常在が確認されていた大船渡湾および越喜来湾の定点でプランクトンネット試料を採集し、その ASP 毒を調べたところ、単位ろ水量あたり 7.5 ~ 629pg/L (越喜来湾、6 月、10 月)、20 ~ 165pg/L (大船渡湾、9、10 月) 検出され、さらに大船渡湾の 10 月試料からは (1) で記したように *P. multiseriis* の分離に成功したが、両湾に垂下したホタテガイおよびムラサキガイからは毒は検出されず、津波の影響により両湾の記憶喪失性貝中毒ポテンシャルが上昇することはなかったものと考えられた。

震災以前に *N. navis-varingica* の分布が確

認されていた岩手県大槌湾小槌河口から千葉県市原市養老河口にかけて、毎年夏季に同種の分布調査を行った結果、2011 年すべての地域で未確認、2012 年大槌湾小槌河口および福島県相馬北、2013 年大船渡湾盛河口、日立市久慈河口、千葉県市原市養老河口でその分布が確認された。その出現順位は津波による被害が大きいと思われた北部が先であった。その理由として、1) 北部の河口構造が津波の被害を受けにくい、2) 津波で消失した *N. navis-varingica* が津軽暖流から新たに流入した、ことなどが考えられる (投稿準備中)。

(7) 毒生産に及ぼす細菌の影響は、*P. multiseriis* の場合が最も顕著であることがこれまで明らかになっている。*N. navis-varingica* の場合は、本研究により DA の増加および IA の減少に関わることが明らかになった。ハヤヤナギの場合は、その影響ははっきり確認できなかった。

## 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 8 件)

Donia Bouchouicha Smida, Nina Lundholm, Wiebe H.C.F. Kooistra, Inès Sahraoui, Maria Valeria Ruggiero, Yuichi Kotaki, Marianne Ellegaard, Christophe Lambert, Hassine Hadj Mabrouk, Asma Sakka Hlail. Morphology and molecular phylogeny of *Nitzschia bizertensis* sp. nov. - a new domoic acid-producer. *Harmful Algae*. (査読有) 2014, 32, 49-63. doi: 10.1016/j.ha.2013.12.004

Hong-Chang Lim, Chui-Pin Leaw, Suriyanti Nyun-Pau Su, Sing-Tung Teng, Gires Usup, Normawaty Mohammad Noor, Nina Lundholm, Yuichi Kotaki, Po-Teen Lim. Morphology and molecular characterization of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from Malaysian Borneo, including a new species of *Pseudo-nitzschia circumspora* sp. nov. *J. Phycol.* (査読有) 2012, 48, 1232-1247. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01213.x

Marc Lawrence J. Romero, Yuichi Kotaki, Juan Relox, Jr., Nina Lundholm, Yoshinobu Takata, Masaaki Kodama, Yasuwo Fukuyo, and Yuichi Kotaki. Two new ASP toxin production types in strains of *Nitzschia navis-varingica* from the Philippines. *Coast. Mar. Sci.* (査読有) 2012, 35(1), 67-69. ISSN 1349-3000

Hikmah Thoha, Yuichi Kotaki, Lily Panggabean, Nina Lundholm, Hisao Ogawa, Lim Po Teen, Yoshinobu Takata, Masaaki Kodama, Yasuwo Fukuyo, Screening of

diatoms that produce ASP toxins in southernmost Asian waters. *Coast. Mar. Sci.* (査読有) 2012, 35(1), 34-38. ISSN 1349-3000

Hong-Chang Lim, Po-Teen Lim, Suriyanti Nyun-Pau Su, **Yuichi Kotaki**, and Chui-Pin Leaw. 2012. Morphological observation of two species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae). (査読有) 2012, *Coast. Mar. Sci.* 35(1): 52-57. ISSN 1349-3000

Lene Ruz Hansen, Stine i Soylu, **Yuichi Kotaki**, Øjvind Moestrup, Nina Lundholm. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae* (査読有) 2011. 10 (6), 689-696. doi:10.1016/j.hal.2011.05.004

Osamu Kimura, **Yuichi Kotaki**, Naoya Hamaue, Koichi Haraguchi, Tetsuya Endo. Transcellular transport of domoic acid across intestinal Caco-2 cell monolayers. *Food and Chem Toxicol.* (査読有) 2011 49, 2167-2171, doi:10.1016/j.fct.2011.06.001.

Marc Lawrence J. Romero, **Yuichi Kotaki**, Nina Lundholm, Hikmah Thoha, Hisao Ogawa, Juan R. Relox, **Ryuta Terada**, Shigenobu Takeda, Yoshinobu Takata, Koichi Haraguchi, Tetsuya Endo, Po-Teen Lim, Masaaki Kodama, Yasuwo Fukuyo. Unique amnesic shellfish toxin composition found in the South East Asian diatom *Nitzschia navis-varingica*, *Harmful Algae.* (査読有) 2011 10 (5), 456-462. doi:10.1016/j.hal.2011.02.006.

[学会発表](計 6件)

**小瀧裕一**・吉田健一・境野智・品田祥汰・一番ヶ瀬裕司・松井麟太郎、わが国の記憶喪失性貝毒生産珪藻 *Nitzschia navis-varingica* の分布特性、平成 25 年度日本水産学会秋期大会 H25.9.21.三重大学、要旨集 p. 103.

**小瀧裕一**・一番ヶ瀬裕司・松井麟太郎・吉田健一・Lundholm Nina、震災後の記憶喪失性貝毒生産底生珪藻 *Nitzschia navis-varingica* の分布調査、平成 25 年度日本水産学会春期大会 H25.3.29 東京海洋大学品川キャンパス、要旨集 p. 179.

**Yuichi Kotaki**, Marc Lawrence J. Romero, Nina Lundholm, Juan R. Relox, **Atsushi Kobiyama**, Koichi Haraguchi, Factors affecting the ASP toxin production of a benthic diatom *Nitzschia navis-varingica*, 15<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae, CECO, Gyeongnam, Korea, 2012. 10. 29 – 11. 2, Abstract p. 204.

**小瀧裕一**・木田龍介・影山一成・原口浩一・Lundholm Nina、記憶喪失性貝毒生

産底生珪藻 *Nitzschia navis-varingica* の分布および毒生産特性-6、平成 24 年度日本水産学会秋期大会 H24.9.16 水産大学校下関市 9.14-9.17 開催、要旨集 p. 121.

**小瀧裕一**・富山崇・澤口敏哉・Lundholm Nina、記憶喪失性貝毒生産底生珪藻 *Nitzschia navis-varingica* の分布と毒生産特性 - 5、平成 23 年度日本水産学会秋季大会 H23.10.1 長崎大学文教キャンパス、要旨集 p. 163.

**Yuichi Kotaki**, Diatom factory producing amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid and its isomers, BIT's 1<sup>st</sup> Annual Congress of Marine Biotechnology-2011, Dalian, China, 2011. 4.28, Abstract p. 139.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小瀧 裕一 (KOTAKI, YUICHI)  
北里大学・海洋生命科学部・准教授  
研究者番号：30113278

### (2) 研究分担者

小檜山 篤志 (KOBAYAMA, ATSUSHI)  
北里大学・海洋生命科学部・准教授  
研究者番号：60337988

安元 剛 (YASUMOTO, KO)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号：00448200

寺田 竜太 (TERADA, RYUTA)  
鹿児島大学・水産学部・准教授  
研究者番号：70336329