

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780196

研究課題名（和文）赤潮を引き起こす海洋植物プランクトンは未知なる経路でリン源を獲得するのか

研究課題名（英文）Do the red tide algae obtain phosphorus source through an unknown process?

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・准教授

研究者番号：10432816

研究成果の概要（和文）：植物プランクトンの大増殖に起因する赤潮は、世界各地の水産業に深刻な被害をもたらしている。本課題では、赤潮の発生機構を解明するため、その原因生物による新奇なリン源獲得経路を明らかにしようとした。厳密な培養試験の結果、赤潮原因生物は、様々な形態の有機リン化合物からリン源を獲得し、増殖可能なことを世界で初めて証明した。これらのことは、赤潮の発生に対して有機態リンが極めて重要な役割を果たすことを意味する。

研究成果の概要（英文）：Outbreaks of red tides cause severe damage to aquaculture in the world. To elucidate the mechanism of the red tide outbreaks, this research clarified the utilization of phosphorus compounds by the red tide algae. Our results showed that many kinds of red tide algae were able to utilize various kinds of organic phosphorus such as phosphate diesters. This study therefore suggests the significance of organic phosphorus in outbreaks of red tide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：赤潮、植物プランクトン、有機態リン、リン酸ジエステル、分解経路

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 赤潮の発生にはリンが重要

我が国では、古くから、魚介類を食料資源として利用しながら、養殖などの水産業を発展させてきた。しかし近年、沿岸海域では「赤潮」が多発するようになり、それによって引き起こされる天然・養殖魚介類の大量斃死や毒化が水産業の脅威となっている。そのため、赤潮の発生機構を解明することは、その予察・防除を考える上で重要かつ緊急を要する課題である。

赤潮とは、ある植物プランクトンが大増殖して海面が着色する現象である。したがって、この大増殖を引き起こす因子を特定することが、赤潮の発生機構を明らかにする上で極めて重要になる。植物プランクトンが増殖す

る過程では、細胞を構成する元素（必須元素）である“リン”が要求される。これまで、赤潮原因種のリン源としては、特に無機態リン（リン酸塩、Pi）、あるいは有機リン化合物の一種「リン酸モノエステル、R-Pi（Rは有機物）」が重要視されており、これらのリンが、赤潮の形成において重要な鍵を握ると考えられてきた。

## (2) 「リン酸ジエステル」とは？

しかし一方で、これまで行なわれてきた現場調査によると、沿岸海水中の無機態リンは、赤潮が多発しやすい高水温期には、ほとんど枯渇していることが多い（Itakura et al. 2002. Fish. Sci. 68: 77-86）。また、「リン酸モノエステル」についても、海水中の溶存

有機態リンに占めるその割合は、概ね数%~20%程度と低いことがわかってきた (Turner et al. eds. 2005. Organic phosphorus in the environments)。

これらの化合物に対し、核酸 (DNA・RNA) やリン脂質に代表され、リン酸が2つのエステル結合を介して有機物と結合している「リン酸ジエステル、 $R_1\text{-Pi-R}_2$ 」については、沿岸海水中に溶存する有機態リンの25%~50%以上を占め、「リン酸モノエステル」よりも2~4倍も高い濃度で溶存することが報告されている (Suzumura et al. 1998. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1553-1564)。しかも、国内外のあらゆる沿岸域に広く分布していることが報告されている (Karl & Bailiff 1989. *Limnol. Oceanogr.* 34: 543-558)。

#### (3)ある種の植物プランクトンが「リン酸ジエステル」を利用可能

以上のことを踏まえ、申請者は、植物プランクトンのリン源として「リン酸ジエステル」が重要な役割を果たしているという仮説を立てた。この仮説を検証するため、申請者は海洋に広く分布する植物プランクトンの一種について、「リン酸ジエステル」利用能を検討した。その結果、本藻が当該化合物を増殖に利用可能なことが明らかとなり、世界で初めて海洋植物プランクトンの「リン酸ジエステル」利用能を証明することに成功した。

当該プランクトンは、「フォスフォジエステラーゼ (PDEase)」と呼ばれる酵素を有しており、それにより「リン酸ジエステル」がもつ Pi と R のリン酸ジエステル結合を分解できる。次いで、残るリン酸モノエステル結合をアルカリフォスファターゼ (APase) で分解することで、本化合物からリン酸塩を遊離させ、それを細胞に取り込むと予測される

しかし、「リン酸ジエステル」利用能が検討された海洋植物プランクトンは、前述した1種のみであり、多様な種から構成される赤潮原因種の利用能については全く明らかにされていない。

#### (4)赤潮原因種の「リン酸ジエステル」利用能の解明を目指して

多様な種から構成される赤潮原因種が「リン酸ジエステル」をリン源として利用できるかどうかを明らかにするために、全ての種について培養試験を行うのは、極めて困難である。その一方、上述したように、「リン酸ジエステル」利用の“鍵”となる PDEase の産生能の有無について、迅速かつ簡便に判定可能な方法を開発できれば、当該化合物を利用する可能性が高い赤潮原因種を網羅的に探索できる。さらに、その赤潮原因種を様々な条件下で培養し、それぞれの条件下における PDEase 活性を定量・比較できれば、当該種が

如何なる条件で「リン酸ジエステル」を分解・利用するのかを解析できる。

ごく最近、申請者は、PDEase の基質として、新規蛍光基質を用い、その分解産物由来の蛍光強度を高速定量することにより、従来法よりも約 50 倍以上高い感度で、かつ迅速に PDEase 活性を定量可能な系を開発することに成功した。

#### 2. 研究の目的

そこで本研究では、前述したフォスフォジエステラーゼ (PDEase) 活性定量法を用いて、赤潮原因プランクトンの中で「リン酸ジエステル」を利用可能なものを網羅探索し、その利用能を明らかにすることを目的とする。

2年の研究期間内に以下の小課題に取り組み、目的の達成を目指す。

(1) PDEase 産生能を有する赤潮原因プランクトンを、新規 PDEase 定量系を用いて網羅探索する。

(2) 当該プランクトンの PDEase 活性に及ぼす環境因子・生理状態の影響を調べ、本酵素の産生機作を明らかにする。

(3) 赤潮原因プランクトンに利用可能な「リン酸ジエステル」化合物、それらの利用によって得られる増殖速度・収量等の生理性状を明らかにする。

これらの課題で得られる結果を総括し、赤潮を引き起こす海洋植物プランクトンの「リン酸ジエステル」利用能の詳細を明らかにすることにより、新たなリン源獲得経路を考慮に入れた赤潮発生機構を構築・提示する。

#### 3. 研究の方法

本課題は、小課題1) フォスフォジエステラーゼ (PDEase) を産生する赤潮原因プランクトンの探索、2) PDEase 産生機作の解明、3) 「リン酸ジエステル」利用能の解明、から構成される。

小課題1では、沿岸海水試料より赤潮原因プランクトン細胞を単離して培養株を確立し、その中で PDEase 産生能を有する株を選抜した。

小課題2では、当該産生能を有するものを様々な条件下で培養し、それらの PDEase 活性を定量・比較した。これにより、PDEase 活性に及ぼす環境因子・生理状態の影響を調べ、本酵素の産生機作を解析した。

小課題3では、「リン酸ジエステル」化合物をリン源とした培地で、赤潮原因プランクトン株を培養し、どのような種類の化合物を利用して増殖できるのかを解析した。

これらの試験で得られた知見を総括し、赤潮の発生に対する「リン酸ジエステル」の関与を総合的に考察した、新たな赤潮発生機構

を構築した。

#### 4. 研究成果

本研究により、赤潮原因種を中心とした海洋植物プランクトンによる「リン酸ジエステル」の利用可能性を、世界で初めて明らかにすることができた。特に、「リン酸ジエステル」の利用において“鍵”となる酵素 (PDEase: フォスフォジエステラーゼ) を多くの赤潮原因プランクトンから検出することに成功し、それらの「リン酸ジエステル」利用能を明らかにすることができた (図1)。

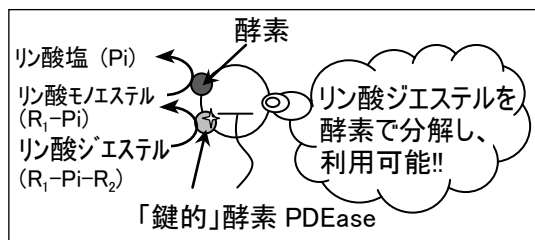


図1 利用モデル. Pi:リン酸塩; R<sub>n</sub>:有機物.

##### (1) PDEase を産生する赤潮原因プランクトンの発見

様々な海域より分離したプランクトン培養株より、PDEase 産生能を有するものを見出すことができた。これらの中には、ノリの色落ちを引き起こす珪藻リゾソレニア・セチゲラ (*Rhizosolenia setigera*) あるいは珪藻キートセロス (*Chaetoceros*) 属などの赤潮原因プランクトンが含まれており、世界で初めて、赤潮原因プランクトンの PDEase 産生能を見出した。

これら選抜した培養株は、温暖な沿岸域に広く分布する種に属することから、本邦の広域にわたって、PDEase 産生能を有する赤潮原因プランクトンが分布していると推察される。また今回、春から冬季にかけてのいずれにおいても、PDEase 産生能を有する赤潮原因プランクトンを分離することができた。以上を踏まえると、温暖な沿岸域では、PDEase 産生能を有する赤潮原因プランクトンが広く分布している可能性が考えられる。

##### (2) PDEase 産生機作の解明

PDEase の産生に影響を及ぼす環境条件ならびにプランクトンの生理状態を調べた結果、本産生能を有する赤潮原因プランクトンは、リン酸塩が豊富にする環境下では PDEase を産生せず、環境水中のリン酸塩が枯渇した時にはじめて PDEase を誘導することがわかった。一方で、環境水中のリン酸塩の充足・不足如何にかかわらず、当該酵素を産生しない赤潮原因プランクトンを見出した。これらより、赤潮原因プランクトンのなかには、

PDEase の産生能を有する種と有しない種が存在すると考えられる。

PDEase 活性には、環境水中のリン酸塩のみならず、水温と pH が相互作用して影響を及ぼすことが判明した。供試したプランクトンの中で、もっとも PDEase 活性が高い珪藻キートセロス (*Chaetoceros*) については、pH 8~10 の高アルカリ条件かつ 20~30°C の比較的高水温な条件下で、その PDEase 活性が増大することがわかった。

本邦を含め、温暖域の沿岸では、夏季に水温が上昇し、それに伴いプランクトンの光合成活性が高まる。表層ではプランクトンによるリン酸塩の消費が進み、しばしば枯渇する場合は頻繁にみられる。これらと本研究で得られた結果を総合すると、夏季のリン酸塩枯渇時に、いくつかの赤潮原因プランクトンは PDEase を誘導することで、「リン酸ジエステル」を利用可能と考えられる。また光合成に伴う pH の増大に伴い、「リン酸ジエステル」を速やかに分解することが示唆される。

##### (3) 「リン酸ジエステル」利用能の解明

海水中にはリン脂質・核酸といった「リン酸ジエステル」化合物が溶存していると考えられている。今回実施した培養試験により、PDEase 産生能を有する赤潮プランクトンは、様々な形態の「リン酸ジエステル」をリン源として利用し、増殖可能なことを証明することができた。

リン脂質をリン源とした場合、それにより得られる増殖収量は、一般的なリン源であるリン酸塩のその 80~95% であった。また核酸についても、多くの赤潮原因プランクトンがリン脂質と同様に利用可能であった。しかし一方で、核酸の利用能は種間で大きく異なり、例えば珪藻キートセロス (*Chaetoceros*) に属する一部の種は、核酸をほとんど利用できないのに対し、同属他種については利用可能となった。

赤潮原因プランクトンの一種、ヘテロシグマ・アカシオ (*Heterosigma akashiwo*) をはじめ、PDEase 産生能を有していないプランクトンは、「リン酸ジエステル」を利用できないことがわかった。このことより、PDEase が赤潮原因プランクトンの「リン酸ジエステル」利用能を決定付ける要因 (図1) になることが実証された。

##### (4) 総括：赤潮の発生に対する「リン酸ジエステル」の関与

本試験により「リン酸ジエステル」の利用能は、赤潮原因プランクトンの PDEase 産生に依存し、種間で大きく異なることがわかった。少なくとも、当該利用能を有する種は、利用能を有しない種よりも、「リン酸ジエステル」から多くのリン源を獲得できる点で、

リン源を巡る競合において極めて有利であると考えられる。また、利用能を有する種間でも、様々な「リン酸ジエステル」化合物を幅広く利用可能な種、あるいは速やかにそれを利用可能な種は、やはりリン源獲得において有利であろう。

赤潮が多発する高水温期は、一般的なリン源であるリン酸塩が枯渇することが多い。このような環境において、PDEase 産生能・「リン酸ジエステル」利用能を有する赤潮原因プランクトンは、他を卓越増殖して赤潮を形成する上で、極めて有利な生態学的特性を有していると考えられる。

本研究で得られた結果に基づいて、申請者は、海洋植物プランクトンのリン源として、これまで全く考慮されてこなかった有機リン化合物「リン酸ジエステル」が、植物プランクトンの大増殖・赤潮という現象を理解する上で大きな鍵となる可能性を、世界に先駆けて明らかにした。このような成果は、国内外を通して報告が無く、画期的知見と位置づけられる。

今回の知見に基づいた赤潮発生機構に従い、今後は、汚濁廃水中に含まれる有機態リンの削減に関する新たな環境基準を設けるなどして、海域の有機汚濁化ならびに赤潮の発生を予防するという、水産被害の軽減に繋がる対策を講じることが必要となろう。

## 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)

[学会発表] (計3件)

- ① 山口晴生, 井上実, 谷本祐子, 外丸裕司. 栄養塩制限下における赤潮珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* の遺伝子発現. 日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3月26日~30日・平成25年)
- ② 山口晴生, 足立真佐雄. 珪藻のリン源獲得経路とは. 2012年度日本プランクトン学会春季シンポジウム「珪藻の生物学」, 東京大学大気海洋研究所 (3月30日・平成24年)
- ③ 山口晴生, 有坂大志, 外丸裕司, 足立真佐雄. 海産微細藻由来のフォスホジエステラーゼ活性を高感度に定量可能な系の確立. 平成24年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3月26日~30日・平成24年)

[その他]

ホームページ

水族環境学研究室

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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・准教授

研究者番号: 10432816

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

外丸 裕司 (TOMARU YUJI)

水産総合研究センター・主任研究員

研究者番号: 10416042

鈴木 怜 (SUZUKI SATOSHI)

高知県水産試験場・主任研究員

研究者番号: なし

山本 圭吾 (YAMAMOTO KEIGO)

大阪府環境農林水産総合研究所・主任研究員

研究者番号: 80503937

一見 和彦 (ICHIMI KAZUHIKO)

香川大学・准教授

研究者番号: 70363182

片野 俊也 (KATANO TOSHIYA)

佐賀大学 低平地沿岸海域研究センター・

准教授

研究者番号: 00509820