

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450256

研究課題名(和文) 混合栄養性有毒渦鞭毛藻と餌生物との動的関係

研究課題名(英文) Relationship between occurrence of the mixotrophic dinoflagellates and its prey organism in natural seawater

研究代表者

石川 輝 (ISHIKAWA, AKIRA)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：00273350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：伊勢湾内に設けた調査点から混合栄養性有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis acuminata* を採取して、その細胞の食胞内に残存する遺伝子を解析し餌生物の特定を試みた。その結果、いずれの *D. acuminata* 細胞からも繊毛虫 *Mesodinium rubrum* が検出された。さらに、調査点において *D. acuminata* と *M. rubrum* の出現関係を季節的に調べたところ、*D. acuminata* の増減は、やはり餌生物である *M. rubrum* の出現により左右されている場合があることを示し得た。なお、本研究では *D. rotundata* についても、*D. acuminata* と同様の研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Gene analyses in the food vacuoles of the natural cells of *D. acuminata* collected from an enclosed port located at Ise Bay, central Japan, were pioneered in this study. From the gene evidences, *M. rubrum* was revealed as prey item. Water sampling was also conducted weekly or biweekly at the port from March 2012 to July 2015. The water samples were preserved with Bouin's solution and both organisms (*D. acuminata* and *M. rubrum*) were enumerated under a microscope. The temporal changes in the abundances of both organisms often displayed the dynamics in which *D. acuminata* was flourished after the increase of *M. rubrum* and vice versa, indicating their prey-predator relationship in nature. In this study, prey organisms and prey-predator relationship for the toxic dinoflagellate *D. rotundata* were also revealed in nature.

研究分野：浮遊生物学

キーワード：有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属 餌生物 繊毛虫

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属の中には下痢性貝毒を産生し、二枚貝類を毒化させる有毒種が知られている。その中でも本邦沿岸水域において大量に出現し、たびたび貝毒被害をもたらしてきた混合栄養性の *D. acuminata* と *D. fortii* は、これまでの培養実験により繊毛虫 *Mesodinium rubrum* を餌として増殖することが明らかにされている。しかし、自然水域においてこれら *Dinophysis* 属と *M. rubrum* との出現関係について調べられた例はほとんどない。

従って、自然界において、下痢性貝毒の最警戒種である *D. acuminata* と *D. fortii* をはじめとする有毒種の餌を特定し、またそれら餌との動的関係を詳細に明らかにすることは、有毒 *Dinophysis* 属の発生機構を解明する上で極めて重要な課題であった。また、特定された餌の出現をモニターすることは、その後の *Dinophysis* 属細胞の発生と増加を予測することにもつながり、将来的には下痢性貝毒の予防にも寄与するものと期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでに実際に下痢性貝毒が発生している三重県伊勢湾を調査対象海域として、現場から採集した *D. acuminata* 細胞の食胞内に残存する遺伝子を解析して餌生物の特定を試みた。これと同時に、*D. acuminata* の出現と、*M. rubrum* の出現を長期にわたり高頻度で調べ、自然界における両者 (*Dinophysis* 属と *M. rubrum*) の間の動的関係を調べた。

本研究課題は、以上の調査・実験により得られた成果を基に、餌生物との関係から自然界における混合栄養性有毒渦鞭毛藻 *D. acuminata* の発生機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 餌生物の解析

三重県白塚漁港内に調査地点を設け、2012年3月から2015年5月にかけて調査を行った(本研究課題に着手した2013年4月以前から調査は行っていた)。プランクトンネットを用いて現場海水を濃縮し、そのサンプルの

中から食胞を持つ *D. acuminata* 細胞を顕微鏡下で単離し、細胞ごとチューブに入れてDNAを抽出した。抽出したDNAに対して、universal primer setを用いて18S rDNAをターゲットにしたPCRを実施した。次に、*Dinophysis* 属のDNAのみを切断する制限酵素を用いて、*D. acuminata* のバンドを切断し、切断されずに残った餌生物のバンドをアガロースゲルから抽出した。この遺伝子のDNA配列を解析することによって、餌生物を特定した。

なお、調査点に出現する従属栄養性有毒種である *D. rotundata* の餌生物も同様の方法によって調べた。

(2) 現場における出現調査

三重県白塚漁港内に設けた調査地点において、2012年3月から2015年7月にかけて採水を行った(上述の通り、本研究課題に着手する前から採水は行っていた)。調査頻度は、毎年3月から11月はほぼ毎週とし、それ以外の時期は隔週とした。この調査点で、プラスチック製のバケツを用いて表層の海水を採取し、そのうち500mLをポリ瓶に分取して実験室に持ち帰った。その後、直ちにブアン溶液で最終濃度が10% (v/v) になるように固定した。固定した試水のうち100mLをウタモールチャンバーに取り分け、倒立顕微鏡による *D. acuminata* と *M. rubrum* の計数に供した。なお、*D. rotundata* と(上記(1)の方法により判明した)その餌生物も同様に計数した。

現場調査では、同時に水温と塩分の測定も行った。

4. 研究成果

(1) 餌生物

D. acuminata の食胞内に残存した遺伝子を制限酵素処理を行うことによって解析した結果、いずれの細胞からも繊毛虫の *M. rubrum* のみが検出された。これまで培養実験により、*D. acuminata* は *M. rubrum* を餌として増殖することが明らかにされてきた。つまり、この結果は *D. acuminata* は現場自然水域においても *M. rubrum* を餌としていることを初めて実証したものである。

一方, *D. acuminata* と同様の方法で解析した *D. rotundata* 細胞の食胞中遺伝子からは, いくつかの繊毛虫種が検出された。それらは, *M. rubrum* 以外に, 無殻繊毛虫では *Strombidium* sp., *Laboea* sp. など, 有殻繊毛虫では *Tintinnopsis radix*, *Helicostomella subulata* などであった。このように, 従属栄養性の *D. rotundata* は現場水域において様々な餌を捕食していることが判明した。

(2) 現場における出現

現場白塚港において *D. acuminata* は, 毎年ほぼ同様の出現傾向を示した。すなわち, 4月から10月にかけて多く出現した。本研究期間中における最大の細胞密度は2012年6月下旬の $7,590 \text{ cells L}^{-1}$ であった。調査期間を通して水温は概ね7-31の間で変化したが, 細胞密度が相対的に高く ($> 300 \text{ cells L}^{-1}$) なる時期の水温は14-31であった。一方, 塩分は調査期間20-33の間で変化したが, この変化幅のほぼ全体にわたって *D. acuminata* は $> 300 \text{ cells L}^{-1}$ の密度で出現していた。このことから, 本種の出現には塩分ではなく水温が第一義的に影響を及ぼしているものと考えられた。

M. rubrum は調査期間を通してほぼ常に出現し, その密度は $20 - 4,900 \text{ cells L}^{-1}$ の間で変化した。*D. acuminata* が出現した期間において, *D. acuminata* と *M. rubrum* の出現関係をみたところ, *M. rubrum* の細胞数が増加した後, *D. acuminata* の細胞数が増加し, 反対に *M. rubrum* が減少した後に *D. acuminata* が減少する場合が多いことが明らかとなった。このことは, 現場における *D. acuminata* の増減は, やはり餌生物である *M. rubrum* の出現により左右されていることを示しているものである。

D. rotundata の現場における出現においても, 食胞中の遺伝子解析で明らかになった餌生物との間には, *D. acuminata* の場合と同様の傾向がみられた。*D. rotundata* の餌生物については, 今後解析が進めばさらに多様な種が検出できる可能性がある。しかし, 少なくとも *D. rotundata* の出現は本研究で明らかになった数種の餌生物に依存するところが大き

いものと推察される。

(3) まとめ

本研究課題により, *D. acuminata* が現場自然水域においても *M. rubrum* を餌として増殖していることが実証された。また, これまで未知であった *D. rotundata* の餌生物も初めて明らかにすることができた。現場においても *D. acuminata* ならびに *D. rotundata* と餌生物の間には捕食—被捕食の関係が見られたことから, これら *Dinophysis* 属2種の自然界における増加を餌となる生物の出現を指標として推測できる可能性がある。

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6件)

Wells, M.L., Trainer, V.L., Smayda, T.J., Karlson, B.S.O., Trick, C.G., Kudela, R.M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D.M., Cochlan, W.P. (2015) Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*, 49: 68-93. 査読有

Ishikawa, A., Hattori, M., Ishii, K., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Ichiro, I. (2014) *In situ* dynamics of cyst and vegetative population of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Ago Bay, central Japan. *Journal of Plankton Research*, 36: 1333-1343. 査読有

Chao, C.-F., Tsai, A.-Y., Ishikawa, A., Chiang, K.-P. (2013) Seasonal dynamics of ciliate cysts and the impact of short-term change of salinity in a eutrophic coastal marine ecosystem. *Terrestrial Atmospheric and Ocean Sciences*, 24: 1051-1061. 査読有

[学会発表](計22件)

Ishikawa, A., Nishitani, G., Kim, Y.-O., Takano, Y., Nagai, S. "Relationship between occurrence of the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* and ciliate *Mesodinium rubrum* in the coastal water of Japan" The 16th International Conference on Harmful Algae, Wellington (New Zealand), Oct. 31 2014

石川 輝, 真野優子, 西谷 豪, 金 英玉, 長井 敏, 自然水域における有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis acuminata* と繊毛虫 *Mesodinium*

*rubrum*出現関係. 日本プランクトン学会・
日本ベントス学会合同大会, 東北大学(宮
城県・仙台市), 2013年9月28日

石川 輝, 嶋田 宏, 麻痺性貝毒原因生
物. 日本水産学会 平成25年度 水産
環境保全委員会 研究会「有害有毒プラン
クトンの分類・生理・生態・生活史・個
体群動態」, 三重大学(三重県・津市),
2013年9月22日

〔図書〕(計 3 件)

西谷 豪, 石川 輝, 高坂祐樹, 今井一郎,
下痢性貝毒原因渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属の
現場生態. 今井一郎, 山口峰生, 松岡數充
(編) 有害有毒プランクトンの科学. 340
(p272-281), 恒星社厚生閣, 東京(2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 輝 (ISHIKAWA AKIRA)
三重大学大学院・生物資源学研究科・教授
研究者番号: 00273350

(2) 連携研究者

西谷 豪 (NISHITANI GOH)
東北大学大学院・農学研究科・助教
研究者番号: 70450781