

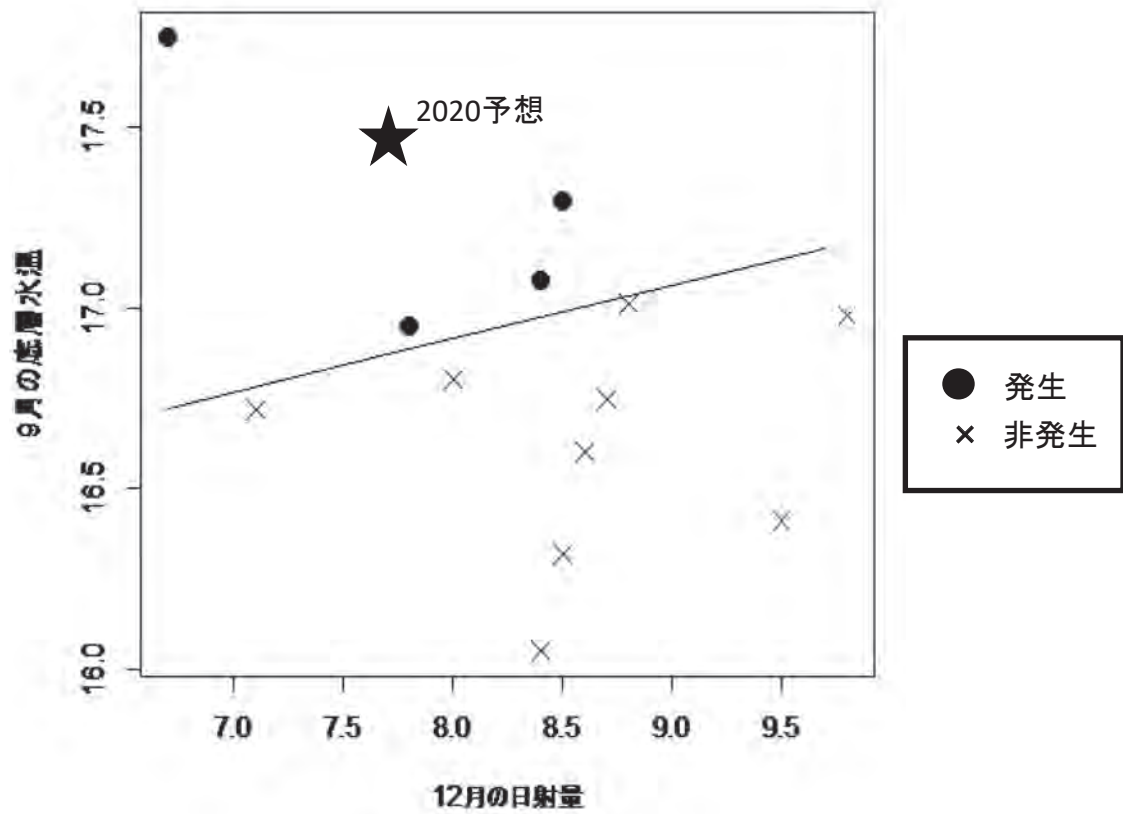


図 50. 鹿児島湾における *Chattonella* spp.による赤潮の線形判別分析結果例. ●発生年, ×非発生年.

表 1. 2020 年九州南部地域における気温、降水量及び日照時間の旬別階級区分（気象庁 HP のデータ改変）.

月	旬	平均気温(平年差 °C)	降水量(平年比 %)	日照時間(平年比 %)
1	上旬	高い (2.1)	少ない (33)	かなり多い (160)
	中旬	平年並み (0.6)	平年並み (62)	かなり少ない (61)
	下旬	かなり高い (4.4)	かなり多い (361)	少ない (73)
2	上旬	平年並み (0.5)	少ない (39)	多い (119)
	中旬	高い (2.1)	多い (194)	少ない (80)
	下旬	高い (2.7)	平年並み (110)	かなり多い (149)
3	上旬	かなり高い (2.2)	多い (151)	少ない (84)
	中旬	平年並み (-0.1)	かなり少ない (11)	かなり多い (141)
	下旬	かなり高い (2.0)	平年並み (88)	平年並み (99)
4	上旬	低い (-0.5)	かなり少ない (24)	かなり多い (149)
	中旬	低い (-0.7)	平年並み (102)	平年並み (113)
	下旬	かなり低い (-2.5)	かなり少ない (0)	かなり多い (150)
5	上旬	高い (1.2)	少ない (47)	平年並み (111)
	中旬	高い (1.1)	かなり多い (269)	平年並み (116)
	下旬	平年並み (0.2)	少ない (33)	少ない (82)
6	上旬	高い (1.0)	多い (116)	平年並み (89)
	中旬	かなり高い (1.9)	平年並み (112)	少ない (56)
	下旬	平年並み (0.3)	かなり多い (163)	多い (126)
7	上旬	低い (-1.0)	かなり多い (424)	かなり少ない (39)
	中旬	かなり低い (-1.9)	平年並み (101)	かなり少ない (51)
	下旬	平年並み (-0.3)	多い (160)	平年並み (96)
8	上旬	高い (0.9)	少ない (25)	多い (125)
	中旬	かなり高い (2.0)	かなり少ない (7)	かなり多い (176)
	下旬	かなり高い (1.1)	多い (152)	平年並み (101)
9	上旬	平年並み (0.4)	かなり多い (268)	少ない (68)
	中旬	平年並み (-0.3)	多い (150)	かなり少ない (45)
	下旬	低い (-0.8)	平年並み (109)	平年並み (97)
10	上旬	高い (0.5)	かなり少ない (20)	かなり多い (135)
	中旬	平年並み (-0.3)	平年並み (51)	少ない (85)
	下旬	平年並み (0.0)	多い (132)	多い (129)
11	上旬	平年並み (-0.4)	多い (141)	平年並み (100)
	中旬	かなり高い (3.3)	平年並み (93)	多い (130)
	下旬	高い (1.2)	かなり少ない (1)	多い (114)
12	上旬	平年並み (0.7)	かなり少ない (5)	平年並み (92)
	中旬	かなり低い (-1.7)	かなり少ない (8)	多い (111)
	下旬	低い (-0.3)	多い (141)	多い (112)

2) 有害赤潮の防除および漁業被害軽減のための技術開発

ア. 魚毒性診断技術の開発

水産研究・教育機構 水産技術研究所（五島）

紫加田知幸

水産研究・教育機構 水産技術研究所（廿日市）

北辻さほ，坂本節子

水産研究・教育機構 水産技術研究所（横浜）

内田肇，及川 寛，鈴木敏之

水産研究・教育機構 水産大学校

山崎康裕

自然科学研究機構 基礎生物学研究所

内山郁夫，西出浩世

大分県農林水産研究指導センター水産研究部

井口大輝，中里礼大，内海訓弘

鹿児島県水産技術開発センター

高杉朋孝，東條智仁，吉満 敏

埼玉大学大学院 理工学研究科

西山佳孝，湯浅光貴

北里大学 医学部

西槇俊之，勝村啓史，小川元之

1 全体計画

(1) 目的

近年，西日本において *Karenia mikimotoi* 等赤潮による甚大な被害が頻発している。有害赤潮は長期化することも多く，魚介類のへい死という直接的な被害だけでなく，餌止めなどの対策を講じることによって生じる「間接的な損失」も大きい。一方で，赤潮の魚毒性は赤潮原因プランクトンの生理状態等によって大きく変動することが知られている。そのため，魚毒性が高い時に餌止め等の苦肉の策を限定すれば被害軽減につながるはずである。しかしながら，赤潮による魚類のへい死機構は未だ詳細不明であり，現場適用可能な魚毒性定量技術は開発されていない。本課題では，各種簡易バイオアッセイ系や分子生物学的・分析化学的指標（活性酸素マーカー，遺伝子発現，生物毒など）を用いた魚毒性診断技術を開発し，最終的にマニュアル作りを行う。

2 令和2年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ。ただし、本年度は調査予定海域において *Chattonella* 属の赤潮が発生しなかったため、赤潮発生時に計画していた調査や実験を実施できなかった。

(2) 方法

1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発（水技研 [五島]，基生研）

令和2年度は有害赤潮が非発生であったため、既存のトランスクリプトームデータの解析を行い、*Chattonella* の魚毒因子に関する情報を整理した。*Chattonella* の魚毒性と活性酸素や NADPH のレベルは関係することが分かっているが、活性酸素を除去する酵素処理を施しても魚毒性は低下しないこと（小田・山口 2013）やキサンチンオキシダーゼを用いて人工的に産生したスーパーオキシドは魚毒性を持たないことが知られている（Marshall et al. 2003）。そのため、活性酸素産生や NADPH 産生の過程で産生される化合物が直接的な魚毒因子である可能性もある。平成31年度の解析から、NAD 代謝に関与する酵素が強毒株で高いことが見出された。そこで、今回はスーパーオキシド産生レベルおよび魚毒性の異なる4株の *Chattonella antiqua* および *Chattonella marina* から得られたトランスクリプトームデータを解析し、より詳細に NADPH 合成系に関連する遺伝子群の発現変動パターンを整理してマップ化した。

2) 簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断技術の確立と現場適用（水大校，水技研 [廿日市]，大分水研，鹿水技）

これまでにシオミズツボワムシ（以下、ワムシ）の毒性や溶血活性は、一部の有害赤潮プランクトンの毒性と相関がある可能性が指摘されている。平成31年度までに、我々はワムシへの毒性や溶血活性の異なる *K. mikimotoi* 等の培養株を見出してきた。令和2年度は、それらの株を用いて、ワムシへの毒性や溶血活性を測定しながら貝類への毒性を検査することで、両社が相関するか否かを検証した。

平成31年度は、*K. mikimotoi* 培養株（IMR04：曝露密度 2.0×10^4 cells mL⁻¹）のクロアワビ稚貝（殻長 41.5 ± 6.0 mm）に対する毒性を確認できなかった（紫加田ら 2020）。一方、Kim et al. (2020) はメガイアワビ稚貝（ 17.2 ± 1.3 mm）やメガイアワビとクロアワビの交雑種（ 15.6 ± 0.5 mm）へ *K. mikimotoi* 培養株（曝露密度： 2.0×10^4 cells mL⁻¹）を曝露すると、それぞれ4時間および6時間以内に全ての個体がへい死したと報告している。これらの先行研究の結果から、*K. mikimotoi* のアワビ類に対する毒性を検出するためには、適切な供試生物の種類、成長段階（殻長）および曝露密度等の検討が必要であると考えられた。そこで本課題では、平成31年度よりも小型のクロアワビ稚貝およびメガイアワビ稚貝を用いて、*K. mikimotoi* の毒性検出に必要な曝露条件を検討した。曝露試験に供した3つの *K. mikimotoi* 培養株（IMR04，KU09，Km69-9ax）を 22°C，12hL:12hD（6:00～18:00 明， $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で維持培養した。500 mL 容トールビーカーに 500 mL の *K. mikimotoi* 培養液（ $5.0 \sim 5.3 \times 10^4$ cells mL⁻¹）およびコントロールとしてろ過海水を入れ、大分県栽培漁業公社から購入したクロアワビ稚貝（殻長

22.4 ± 2.2 mm) およびメガイアワビ稚貝 (殻長 21.8 ± 1.8 mm), それぞれ 6 個体を収容し, 22°C で通気しながら 24 時間曝露した。曝露時の照度は約 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。曝露開始直後, 3, 6, 24 時間目に *K. mikimotoi* 細胞密度, 溶存酸素濃度 (Multi3510IDS, WTW), アワビのへい死個体を計数した。曝露試験は 3 回繰り返した。なお, アワビのへい死は, ピンセットの触診に対する反応が無い状態と定義した。

また, アワビ稚貝への曝露試験と並行して, ワムシアッセイを実施した。ワムシアッセイは 48 ウェルプレート (IWAKI) を用いた紫加田ら (2020) の方法に従い, 22°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で維持培養した 7~9 日目のワムシ培養株 (L 型奄美株) を供した。ワムシを 10 個体ずつウェルに収容後, 改変 SWM-3 培地で希釈して 1.0 × 10² cells mL⁻¹ の細胞密度に調整した *K. mikimotoi* 培養液を添加し, 6 時間培養した。試験は 3 回繰り返して実施した。曝露条件は 22°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし, 曝露開始直後, 2, 4, 6 時間目にワムシの生残を観察した。また, ワムシのへい死率, 溶血度, アワビ稚貝のへい死率の相関関係は, 統計ソフト (R3.6.2) を用いて Spearman の順位相関係数を算出し分析した。

3) 活性酸素レベルを指標にした魚毒性診断技術の確立と現場適用

活性酸素は主たる有害赤潮プランクトンの魚毒性に関与することが知られ, その産生レベルは魚毒性の高低と相関する可能性がある。本課題では, 現場赤潮海水の活性酸素濃度 (相対値) やそれに関連する生理パラメータを計測することで魚毒性を推定する手法を確立することを目的とした。

①現場で活用可能なスーパーオキシド (O₂⁻) 計測法の確立と検証 (水大校)

化学発光試薬を用いた手法は検出感度が高く, 赤潮プランクトンの O₂ を計測する上で適している。しかしながら, 本手法の最大の弱点は一部の渦鞭毛藻のような発光生物が混入すると, 正確な測定値を得ることが難しい点である。これまでに, 吸光度や蛍光を指標にした O₂ 計測法について検討してきた結果, 還元系発色試薬である WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, 同仁化学研究所) を用いた吸光光度法は, 赤潮プランクトンが産生する O₂ を検出可能であったものの, 化学発光法と比べて検出感度が極めて低かった (紫加田ら 2020)。そこで本年度は, WST-1 より検出感度の高い WST-8 (1-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(2,4-disulfophenyl)-5-(4-nitrophenyl)formazan, disodium salt hydrate) を用いて O₂ の計測を実施し, 化学発光法と比較した。なお, *C. antiqua* の培養には Mn を除いた改変 SWM-3 培地 (以下, Mn 無添加培地) を用いた。

本課題では, 還元系発色試薬である WST-8 (同仁化学研究所) を用いた吸光光度法による O₂ の検出について検討を行った。まず, 100 mL 容ガラスフラスコに 40 mL の *C. antiqua* 培養液 (NIES-1 株, 初期細胞密度: 100 cells mL⁻¹) を添加し, 温度 25°C, 14hL:10hD, 明期 6:00 ~ 20:00, 照度 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および白色光の光条件で培養した。また, 吸光光度法と化学発光法による O₂ の計測, および *C. antiqua* 細胞の計数は, 培養開始から 2 日ごとに実施した。

WST-8 を用いた O_2^- の計測は、ガラス試験管 ($\phi 12 \times 75$ mm, Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて実施した。まず、ガラス試験管に 194 μ L の *C. antiqua* 培養液を添加した後、6 μ L の PBS もしくは PBS に溶解したスーパーオキシドジスムターゼ溶液（以下、SOD、富士フイルム和光純薬株式会社、最終濃度：200 units mL^{-1} ）および 20 μ L の WST-8 溶液（最終濃度：1.8 mM）を順次添加した。また、対照区には Mn 無添加培地を用いた。その後、試料の入ったガラス試験管は、温度 25°C、200 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ 、白色光の光条件で 1 時間静置した。1 時間後、試料は 2 mL 容マイクロチューブへ移して遠心分離（510 $\times g$ 、10 分間、4°C）を行い、各試料の上清 100 μ L を測定用平底 96 ウェルプレート（Becton, Dickinson and Company）に添加した。最後に、得られた各試料の上清における 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー

（MULTISKAN GO, Thermo Fisher SCIENTIFIC）によって測定した。なお、 O_2^- による発色レベルは、試験区および対照区（Mn 無添加培地）の測定値から各試験区に O_2^- の特異的消去酵素である SOD を添加したときの測定値を差し引いた値とした。

一方、化学発光法による O_2^- の測定は、ルミノメーター（アトー、AB-2270 ルミネッセンサー Octa）を用いて測定した。測定は、10 μ L の L-012 溶液（最終濃度：10 μ M）、20 μ L の PBS もしくは PBS に溶解した SOD 溶液、および 970 μ L の試料溶液を順次添加後、直ちにルミノメーターにて 30 秒間の発光パターンおよび発光レベルの積算値を測定した。なお、検出された化学発光レベルが O_2^- 由来であるか判定するために、SOD の添加によって試料の発光レベルが大幅に減少するか否かを確認した。

② 活性酸素産生に及ぼす有害赤潮プランクトンの生理状態の影響把握

ア．赤潮プランクトンの魚毒性に及ぼす栄養塩の影響解析（水技研 [五島, 廿日市], 北里大）

栄養状態の異なる *C. antiqua* の培養液をマダイ稚魚に曝露し、その毒性を検討した。硝酸塩あるいはリン酸塩無添加の改変 SWM-3 培地（N 欠培地、P 欠培地）もしくは改変 SWM-3 培地（完全培地）、温度 25°C、14hL:10hD、明期 6:00~20:00、照度 400 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ および白色光の光条件で、7 日間培養した *C. antiqua*（4KGY 株、無菌）を実験に供した。マダイは 1 週間以上 25°C で馴致し、一晚餌止めした個体を用いた。30 cm 水槽に培養液または改変 SWM-3 培地（対象区）を 6 L を入れ、マダイ稚魚（体長 9.9 ± 1.1 cm、体重 19.0 ± 6.5 g）を 3 尾ずつ収容して通気した。*C. antiqua* の細胞密度は培養原液を濾過海水で希釈して 3,000 cells mL^{-1} もしくは 1,000 cells mL^{-1} に調整した。培養原液と希釈後の培養液については、上述の化学発光法により O_2^- レベルを計測した。曝露試験は 6 時間行い、マダイ稚魚の観察および溶存酸素濃度（WTW, Multi 3510 IDS）を監視した。マダイが 5 秒以上横臥したままの場合、取り上げた。横臥後および試験終了後、マダイ個体を Davidson 液で全身固定し、組織解析に供した。鰓組織を採取後、定法に従いパラフィン切片作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色および PAS+アルシアンブルー染色を行って光学顕微鏡下で観察した。

イ．赤潮プランクトンの O_2^- レベルに及ぼす水温および塩分の影響解析（水大校）

現場において、赤潮の発生時期によって漁業被害が異なることが経験的に知られており、基本的な環境条件である水温および塩分が赤潮プランクトンの魚毒性に及ぼす影響を把握することにした。本年度は、15通りの水温と塩分の組合せ条件下で培養した *C. antiqua* (NIES-1株、無菌) の O_2 産生レベルを化学発光法により計測した。まず、100 mL 容ガラスフラスコに各塩分 (25, 30 および 35) の *C. antiqua* 培養液 (初期細胞密度: 100 cells mL^{-1}) を 50 mL 添加し、5段階の水温 (20.0, 22.5, 25.0, 27.5 および 30.0°C), 14hL:10hD, 明期 6:00~20:00, 照度 $200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ および白色光の光条件で培養した。また、化学発光法による O_2 の計測および *C. antiqua* 細胞の計数は、培養開始から2日ごとに実施した。

ウ. NADPH オキシダーゼ (NOX) の定量法の確立 (埼玉大)

これまでの室内実験により、 O_2 の産生酵素である NOX の細胞内動態と魚毒性が関与する可能性が示唆された。そこで、本研究では NADPH を定量する手法を確立するとともに、NADPH の細胞内動態に関与する条件を明らかにすることを目的とした。

A. ペプチド抗体を用いた NOX の定量

これまでに、*Chattonella* の RNA-seq データから推定された7つの NOX 候補遺伝子のうち、転写物量と魚毒性に正の相関が見られる NOX23465 遺伝子に対するペプチド抗体 (ユーロフインジェノミクス) を作製してウェスタン法による NOX タンパク質の発現量解析を試みた。本年度は、魚毒性に関わらず、いずれの *Chattonella* 株でも転写物量の多い NOX21661 遺伝子および NOX25216 遺伝子にも着目してペプチド抗体を作製し、*Chattonella marina* の魚毒性と O_2 産生レベルが高い株 (Ago-03 株; 強毒株) と低い株 (Ago-04 株; 弱毒株) の NOX タンパク質の発現解析を試みた。2株を 25°C, 12hL:12hD, 明期 6:00~18:00, 照度 $300\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 白色光の条件で継代培養した。両株を初期細胞密度 $2,000\text{ cells mL}^{-1}$ で植え継ぎ、2日間培養した後、遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 5 min) で細胞を集めた。細胞をジルコニアビーズと超音波により破碎し、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) した後、膜画分を得た。膜画分を SDS の添加と加熱 (90°C, 90 sec) で可溶化し、SDS-PAGE (320 V, 20 mA, 130 min) でタンパク質を分離した。NOX23465, NOX21661, NOX25216 に特異的なペプチド抗体を使用し、ウェスタン法で各タンパク質を検出した。その際、それぞれの抗原前血清もネガティブコントロールとして使用し、ペプチド抗体の特異性を検証した。さらに、各抗原ペプチドでブロッキングすることによっても抗体の特性を精査した。なお、実験はそれぞれ3回以上繰り返した。

B. アクリルアミドゲル中における *Chattonella* 膜画分の O_2 産生活性の検出

強毒株 (Ago-03 株) から上記の方法で膜画分を調製し、2% β -Dodecyl maltoside で穏やかに可溶化して、Clear Native-PAGE (100 V, 10 mA, 2 h) でタンパク質を複合体の状態で分離した。アクリルアミドゲル中での O_2 産生活性の検出には、Sagi and Fluhr (2001) を参考に NBT 還元法を用いた。タンパク質を分離した後のゲルを検出液 (0.2 mM NBT, 0.1 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl [pH7.4]) に浸し、暗所で20分間振とうした。その後、2, 20, 200 μ M NADPH または 200 μ M $NADP^+$, 200 μ M NADH を添加して、暗所で30分間振とうし、生成した O_2^- を青色

の NBT 染色バンドとして検出した。さらに、NBT の染色が NOX 由来かどうかを確認するために、動植物で実証済みの NOX 阻害剤 Diphenyleneiodonium (DPI, 終濃度 5 μM) またはその溶媒である Dimethyl sulfoxide (DMSO) の存在下で強毒株を 1 時間培養した。その後、膜画分を調製し、ゲル中で O_2^- 産生活性を検出した。なお、実験は 3 回以上繰り返した。

4) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

魚毒性の指標となり得る化合物を見出すことを目的として、LC/MS/MS 等を用いた化学分析を実施した。

①LC/MS/MS による魚毒成分探索 (水技研 [横浜, 廿日市, 五島])

Chattonella の魚毒因子と考えられている脂肪酸の過酸化物について LC/MS 分析条件の検討を行った。

また、平成 31 年度、3 株の *K. mikimotoi* のノンターゲット分析によって検出した魚毒性と関連する化合物群について、さらに株数を増やして検証した。まず、10 株の *K. mikimotoi* 培養株の魚毒性を調べた。本種を $19\pm 1^\circ\text{C}$, 12h:12hD, 照度 $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 白色光, 改変 SWM-3 培地で培養して増殖させた後、適宜培地で希釈して $20,000\ \text{cells mL}^{-1}$ に細胞密度を調整した培養液 3 L を 30 cm 水槽に注入した。その後、マダイ稚魚 (体長: $10.4\pm 1.3\ \text{cm}$, 体重: $5.9\pm 1.3\ \text{g}$) を収容し、最長 6 時間観察した。横臥した個体は速やかに取り上げた。次に、遠心分離により得た 10 株の細胞ペレットを 100%アセトンで抽出し、LC/QTOF 分析等に供した。

②魚毒性と糖含有量の関係把握 (水大校, 水技研 [五島])

有害赤潮プランクトンが有する細胞外多糖は粘性の原因となり、魚毒性と関与すると考えられている。本年度は、栄養状態の異なる *C. antiqua* についてフェノール硫酸法により細胞乾重量あたりの糖含有量を計測し、比較した。*C. antiqua* (4KGY 株) を 25°C , 14h:10hD (6:00 ~ 20:00 明, $400\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) の条件で 7 日間培養し、培養液 150 mL を遠心にかけてペレットを作製し、 -20°C で冷凍保存した。乾燥試料に超純水を添加し、超音波碎波機 (トミー精工, UR-21P) を用いてホモジナイズ後、遠心にかけて上清を回収して水溶性成分を得た。次に、水溶性成分に 99.5 % エタノールを添加して一晩 4°C で静置した後、遠心して上清を除去し、99.5 % エタノールを添加した。超音波発生装置で不溶物を再懸濁させ、遠心にかけて上清を除去した。風乾後、試料に超純水を添加し、不溶物を超音波発生装置で十分に懸濁させた。得られた糖類の粗抽出液について、フェノール硫酸法による比色定量を行った。吸光度 (480 nm) はマイクロプレートリーダーによって測定した。なお、検量線作成のための全糖の標準品として、D (+)-Glucose を用いた。

5) 赤潮に曝露された魚介類の組織学的特徴の整理 (北里大, 水技研 [五島])

赤潮が直接の原因で変調をきたしている、あるいはへい死した養殖魚に特異的な病変は整

理されておらず、特定されていないのが現状である。そこで、令和2年度は *Chattonella* と *K. mikimotoi* の培養株に曝露したマダイおよびブリの鰓について比較解析した。培養株に曝露して瀕死状態（横臥状態）となった魚体、および培養株が入っていない培地（コントロール）に曝露して3時間生残した魚体を Davidson 液で全身固定した。*C. antiqua* および *K. mikimotoi* の曝露密度はそれぞれ $4,000 \text{ cells mL}^{-1}$ および $20,000 \text{ cells mL}^{-1}$ に設定した。マダイの場合は後日鰓組織を採取後、定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは PAS+アルシアンブルー染色を行って光学顕微鏡下で組織像を取得した。得られた画像のうち、マダイは1個体、ブリは2個体について二次鰓弁で見られた剥離数および浮腫数をカウントし、一般化線形混合モデルを用いて各赤潮藻類の二次鰓弁に与える効果の推定を行った。

(3) 結果及び考察

1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

Hashida et al. (2016) および Hashida and Kawai-Yamada (2019) を参考に、L-アスパラギン酸から NADPH までの経路の発現変動を図1に図示した。上流の LASPO や下流の NADK や FNR の遺伝子発現量が強毒株で高いことが明らかとなった。こういった遺伝子群の発現量も魚毒性の指標となる可能性がある。

2) 簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断技術の確立と現場適用

①ワムシへの毒性を指標とする魚毒性診断法の確立

K. mikimotoi 培養株に曝露されたクロアワビ稚貝およびメガイアワビ稚貝の24時間後のへい死率は、IMR4株でそれぞれ50%および55%、KU9でそれぞれ6%および0%、ax69-9ではそれぞれ11%および0%であった（図2）。なお、曝露試験中の溶存酸素濃度は 7.8 mg L^{-1} 以上を保った。Kim et al. (2020) は、*K. mikimotoi* を曝露されたメガイアワビ稚貝のへい死率がクロアワビとメガイアワビの交雑種の稚貝よりも高くなったことを報告しているが、同程度のサイズのアワビを供した本課題では、クロアワビ稚貝とメガイアワビ稚貝との間にへい死率の差は認められなかった。また、ワムシ毒性はIMR4で高く、KU9およびax69-9で低いという結果が得られ（図3）、クロアワビ稚貝およびメガイアワビ稚貝への毒性と一致した。過去に得られた各培養株（曝露密度： $2.2 \sim 2.6 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ ）の溶血活性の結果（紫加田ら 2020）を改訂し、図4に示す。溶血度は、IMR4（57.6%）と比べると、KU9（12.0%）およびax69-9（14.1%）で低く、ワムシへの毒性と一致した。相関分析の結果、2種稚貝のへい死率とワムシへの毒性や溶血活性間で正の相関が認められたが、有意な相関関係が認められたのは溶血活性とクロアワビのへい死率間のみであった（表1）。今後、株数を増やすなどを行って更なる検証を進める。

3) 活性酸素レベルを指標にした魚毒性診断技術の確立と現場適用

①現場で活用可能な O_2 計測法の確立と検証

図 5 は、*C. antiqua* の増殖、および吸光光度 (WST-8) 法と化学発光法による O_2 の計測結果を示している。吸光光度法では、培養 4 日目まで試験区と対照区 (Mn 無添加培地) の測定値に差異が認められなかったため、*C. antiqua* 由来の O_2 を検出できなかった (図 5b)。なお、*C. antiqua* 由来の O_2 を検出できたのは、培養 6 日目であった (図 5b)。一方、化学発光法では、培養 2 日目から *C. antiqua* 由来の O_2 を検出できたことから (図 5c)、化学発光法の検出感度は極めて高いことが示唆された。また、 O_2 が検出できなかった培養 4 日目までの *C. antiqua* 細胞密度は $1,300 \text{ cells mL}^{-1}$ 未満であり、 O_2 が検出できた培養 6 日目の *C. antiqua* 細胞密度は $6000 \text{ cells mL}^{-1}$ 程度であった (図 5a)。昨年度に検討した吸光光度 (WST-1) 法では $5,000 \text{ cells/mL}$ 程度で *C. antiqua* 由来の O_2 が検出できたことから (紫加田ら 2020)、 $1,300 \sim 5,000 \text{ cells/mL}$ の間に吸光光度法による O_2 検出の閾値が存在すると推定された。

以上の結果より、吸光光度法は化学発光法と比べて検出感度が著しく低いことから、現場における増殖初期の *Chattonella* 属の魚毒性診断への活用が困難であると判断された。今後、現場での魚毒性診断に化学発光法を活用するためには、発光生物などの O_2 検出の阻害要因を排除する手法を確立するとともに、現場で簡便に計測できる他の O_2 検出手法や魚毒性診断の指標となる新たな因子の探索も併せて検討したい。

②活性酸素産生に及ぼす有害赤潮プランクトンの生理状態の影響

ア. 赤潮プランクトンの魚毒性に及ぼす栄養塩の影響

C. antiqua を $3,000 \text{ cells mL}^{-1}$ で曝露した場合のマダイの横臥率は、完全培地と比べて、N 欠培地および P 欠培地で高く、N 欠培地よりも P 欠培地で高かった (図 6)。更に、P 欠培地については、*C. antiqua* の細胞密度を 3 分の 1 に設定して曝露試験を実施したが、それでも高い横臥率が得られた。これらのことから、*C. antiqua* は栄養塩欠乏、特にリン欠乏で魚毒性が大きく上昇することと考えられた。一方で、既往知見 (Yuasa et al. 2020) と同様に、*C. antiqua* の O_2 レベルは完全培地と比べて N 欠培地および P 欠培地で高かったが、N 欠培地と P 欠培地との間でほとんど差は認められなかった (図 7)。以上のことから、 O_2 レベルは栄養塩欠乏時の魚毒性の上昇を反映するが、リン欠乏時に魚毒性を過小評価あるいは窒素欠乏時に魚毒性を過大評価する可能性が示唆された。また、栄養塩欠乏時に横臥したマダイ鰓を観察すると、完全培地と比べて、N 欠培地および P 欠培地でより著しい損傷や粘液付着が認められ (図 8)、魚毒性の高さと整合した。

イ. 赤潮プランクトンの O_2 レベルに及ぼす水温および塩分の影響

図 9 に示すように、計 15 通りの水温と塩分の組合せで培養した瀬戸内海産 *C. antiqua* の増殖速度について、本研究で得られた増殖特性は、先行研究で報告された室内実験 (大阪湾株) の結果 (山口ら 1991) や現場 (瀬戸内海) における赤潮発生水温の状況 (今井 2012) と良

く一致していた。一方で、*C. antiqua* 培養液の O_2 -レベルは水温 22.5~25.0°C、塩分 25~30 で高くなる傾向にあった（図 9d~i）。特に、25.0°C、塩分 25 および 30（以下、至適条件とする）では、*C. antiqua* の最大到達密度や培養液の O_2 -レベルが他の試験区より高かった（図 9g, h）。同様に、22.5°C、塩分 25 と 30 では、*C. antiqua* の最大到達密度や培養液の O_2 -レベルが高かったものの（図 9d, e）、増殖は至適条件より遅い傾向にあった。また、20.0°C の条件下では *C. antiqua* の増殖が至適条件より緩やかであり、特に塩分 35 の条件下では増殖が低調であった（図 9a）。増殖の状況と同様に、*C. antiqua* 培養液の O_2 -レベルは緩やかに上昇し、培養開始から 18 日後においても高い O_2 -レベルを維持していた（図 9b）。一方、27.5°C および 30.0°C の条件下では、水温や塩分が高くなるほど最大到達密度や培養液の O_2 -レベルは至適条件より低かったのに対し（図 9j, k, m, n）、培養開始 2 日後における細胞あたりの O_2 -レベルは 20.0~25.0°C の条件と比較して高かった（図 9c, f, i, l, o）。以上の結果より、*C. antiqua* は、現場で赤潮を形成するような水温・塩分条件において O_2 産生レベルが高くなることがわかった。

ウ. NADPH オキシダーゼの定量法の確立

A. ペプチド抗体を用いた NOX の定量

3 種の NOX（NOX23465, NOX21661, NOX25216）に対するペプチド抗体を用いてウェスタン解析したところ、*C. marina* の強毒株（Ago-03 株）、弱毒株（Ago-04 株）の膜画分から複数のバンドが検出された（図 10）。しかし、これらのバンドは抗原前血清を用いても検出された。また、抗原ペプチドで抗体をブロッキングしても、消失するバンドは見られなかった。したがって、今回作製したペプチド抗体は NOX に対する特異性が低いと考えられた。

B. アクリルアミドゲル中における *Chattonella* 膜画分の O_2^- 産生活性の検出

強毒株（Ago-03 株）の膜画分の O_2^- 産生を解析したところ、2~200 μ M NADPH 存在下で 480~720 kDa の位置に NBT 染色バンドとして検出された（図 11）。そのバンド強度は高い NADPH 濃度下で上昇した。一方、200 μ M $NADP^+$ または 200 μ M NADH の存在下では、NBT 染色バンドは検出されなかった。さらに、NOX 阻害剤の DPI を *Chattonella* 培養液に添加し、膜画分を調製して O_2^- 産生を同様に検出した結果、溶媒 DMSO の添加と比較してバンド強度が大幅に低下した（図 12）。以上の結果から、既往知見（Kim et al. 2007）でも指摘されているように、*Chattonella* の膜画分に NOX 活性があり、NADPH の還元力を利用して O_2^- を産生することが示唆された。また、NOX の推定分子量が 60-90 kDa であるが、それよりも高分子の 480-720 kDa 付近に NBT 染色のバンドが検出されたため、*Chattonella* の NOX はタンパク質複合体を形成していることが示唆された。

4) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

① LC/MS/MS による魚毒成分探索

有害赤潮プランクトンおよびへい死した魚介類組織の過酸化脂質分析のため、高速液体クロマトグラフィー四重極-飛行時間型質量分析装置（LC/QTOF）による分析法を検討した。リ

ノール酸[18:2 (n-6)]を酸素下で加熱し、自動過酸化させた試料を用いて分析条件を検討した。リノール酸とリノール酸過酸化物を比較し、約 50%のリノール酸が酸化したことを確認した。リノール酸過酸化物として、リノール酸のヒドロキシペルオキシド体およびヒドロキシ体を検出した (図 13)。LC/QTOF 分析は精密質量の抽出イオンクロマトグラムにより、選択的に過酸化脂肪酸であるヒドロキシペルオキシド体およびヒドロキシ体を検出可能であることが明らかになった。

K. mikimotoi を曝露した時のマダイ稚魚の横臥尾数は株間で差が認められた (表 2)。まず、LC/QTOF 分析において既知の魚毒性化合物であるブレベトキシンは検出されなかった。次に、株間のイオンクロマトグラムおよび MS スペクトルについて比較解析を行い、各種毒性試験の結果とともに解析し、魚毒性を持つ培養株に特徴的な化合物を検索した。令和元年度に見出したブロード状に溶出される化合物は本年度調製した試料からは検出されなかった。本年度調製した試料の LC/QTOF 分析結果とマダイに対する魚毒性試験の結果を比較し、最も強い魚毒性を示した IMR4 株で比較的多く含まれた m/z 871 の化合物については、マダイ横臥尾数と相関が認められた (図 14)。

②魚毒性と糖含有量の関係 (水大校, 水技研 [五島])

C. antiqua の糖含量は、完全培地と比べて、N 欠および P 欠培地で高く、P 欠培地よりも N 欠培地で高かった (図 15)。栄養塩欠乏状態で上昇する点は魚毒性と一致した。また、今回の結果は栄養塩欠乏状態で魚の鰓によりたくさんの粘液が付着していた組織解析結果 (図 8) と関係している可能性もあるので、今後詳細な解析を進めていきたい。

5) *Chattonella* や *K. mikimotoi* に曝露されたマダイおよびブリの組織学的特徴

マダイおよびブリにおいて、*Chattonella* や *K. mikimotoi* を曝露した場合、コントロールと比べて、二次鰓弁周辺の細胞剥離や浮腫および粘液付着の頻度が有意に高かった (図 16, 17)。さらに、*K. mikimotoi* を曝露した個体では、細胞剥離の頻度は *Chattonella* よりも高く、基底部でも認められた。これらのことからマダイとブリの病変は類似しており、いずれの魚種においても *Chattonella* よりも *K. mikimotoi* に曝露された個体で、二次鰓弁への損傷が大きいことが明らかとなった。

引用文献

- Hashida SN, Kawai-Yamada M. Inter-organelle NAD metabolism underpinning light responsive NADP dynamics in plants. *Front. Plant Sci.* 2019; **10**: 960.
- Hashida SN, Itami T, Takahara K, Hirabayashi T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M. Increased rate of NAD metabolism shortens plant longevity by accelerating developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2016; **57**: 2427-2439.

- 今井一郎. シャットネラ赤潮の生物学. 生物研究社, 東京. 2012 ; 171 pp.
- Kim D, Nakashima T, Matsuyama Y, Niwano Y, Yamaguchi K, Oda T. Presence of the distinct systems responsible for superoxide anion and hydrogen peroxide generation in red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *J. Plankton Res.* 2007; **29**: 241-247.
- Kim D, Li W, Matsuyama Y, Matsuo A, Yagi M, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi Y, Oda T. Strain-dependent lethal effects on abalone and haemolytic activities of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Aquaculture* 2020; **520** : 734953.
- Marshall JA, Nichols PD, Hamilton B, Lewis RJ, Hallegraeff GM. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polykanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae* 2003; **2**: 273-281.
- 小田達也, 山口健一. シャットネラ属有害プランクトンの毒性発現機構の解明. 平成 24 年度 漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業「赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業」報告書. 長崎. 2013 ; 18-24.
- Sagi M, Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 2001; **126**: 1281-1290.
- 紫加田知幸, 北辻さほ, 坂本節子, 内田肇, 及川寛, 鈴木敏之, 山崎康裕, 内山郁夫, 西出浩世, 井口大輝, 中里礼大, 内海訓弘, 西山佳孝, 西槇俊之. 2) 有害赤潮の防除および漁業被害軽減のための技術開発. 平成 31 年度漁場環境・改善推進事業のうち栄養塩、赤潮・貧酸素水塊に対する被害軽減技術等の開発 (2) 赤潮被害防止対策技術の開発報告書, 赤潮共同研究機関, 広島. 2020 ; 253-288.
- 山口峰生, 今井一郎, 本城凡夫. 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日本水産学会誌 1991 ; **57** : 1277-1284.
- Yuasa K, Shikata T, Ichikawa T, Tamura Y, Nishiyama Y. Nutrient deficiency stimulates the production of superoxide in the noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Harmful Algae* 2020; **99**: 101938.

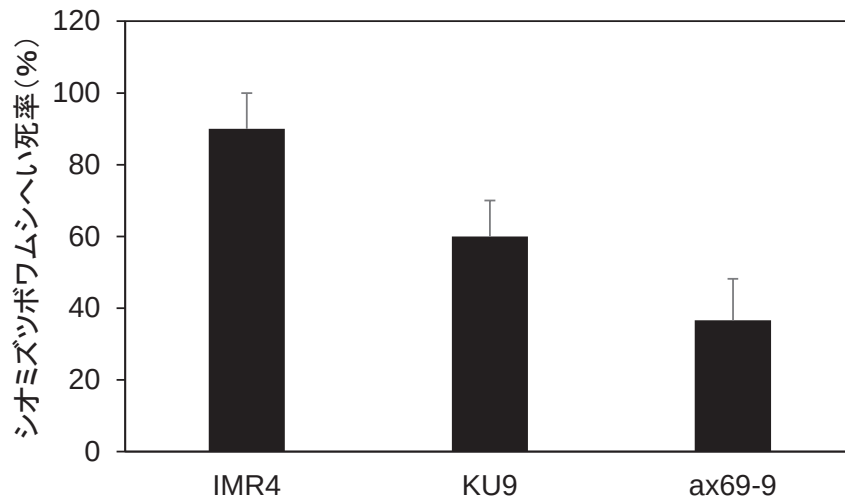


図 3. *K. mikimotoi* 各培養株を 6 時間曝露したシオミズツボウムシのへの死率.

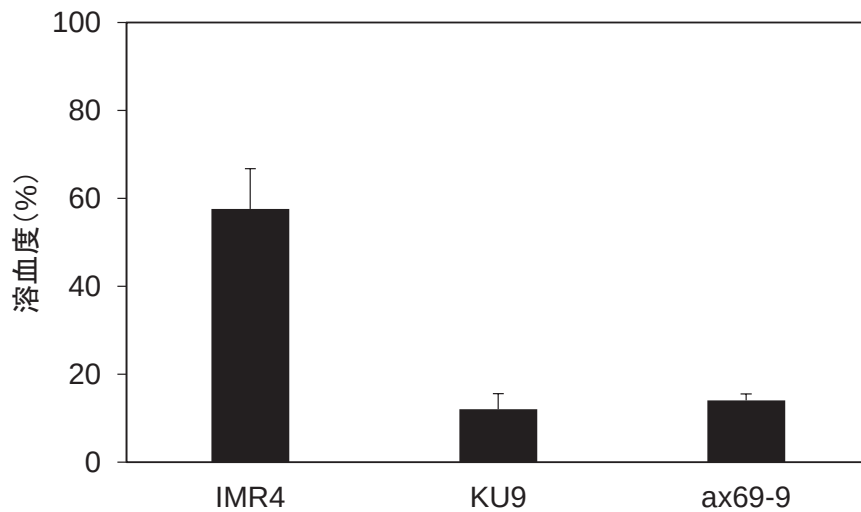


図 4. *K. mikimotoi* 各培養株の溶血活性 (紫加田ら 2020 を改訂).

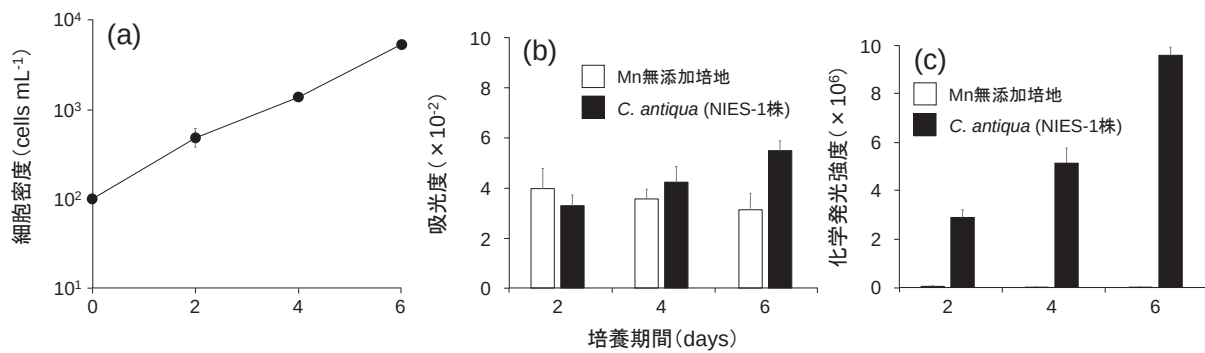


図 5. *Chattonella antiqua* の細胞密度 (a) および吸光光度法 (b) と化学発光法 (c) による O₂⁻ の経日変化.