

図 51. 鹿児島湾における植物プランクトンの組成変化 (Stn. ②, ⑧, ⑪).



図 52. 鹿児島湾における珪藻類の組成変化 (Stn. ②, ⑧, ⑪).





図 54. 鹿児島湾における Chattonella spp.の細胞密度の推移 (Stn. ③, ⑪表層).



図 55. 2015 年以降の鹿児島湾における Chattonella spp.細胞密度の推移 (Stn. ③, ⑪表層).



×0/ •~10未満/ • 10~100未満/ • 100~1000未満/ • 1000~10000未満/ • 10000~ 50000未満/ • 50000~ 図 56. Heterosigma akashiwo 赤潮の水平分布の推移.



図 57. Heterosigma akashiwo の最高細胞密度の推移(全調査点).





図 59. 水温,塩分, DIN, DIP の推移(湾奥部 9 定点平均). 点線は 1,000 cells mL<sup>-1</sup>の *Heterosigma akashiwo* 個体群が維持されるために最低限必要となる濃度(N:1.7 µM, P:0.1 µM).



図 60. 珪藻類の細胞密度の推移 (stn. ②, ⑧, ⑪).

月	旬	平均気温(平年差 ℃)		降水量(平年比%)		日照時間(平年比%)	
1	上旬	かなり低い	(-3.4)	少ない	(35)	平年並	(92)
	中旬	平年並	(0.0)	少ない	(28)	かなり多い	(146)
	下旬	かなり高い	(3.4)	平年並	(94)	平年並	(101)
2	上旬	高い	(1.7)	平年並	(68)	かなり多い	(150)
	中旬	高い	(1.5)	多い	(158)	平年並	(98)
	下旬	かなり高い	(3.2)	平年並	(120)	平年並	(106)
3	上旬	かなり高い	(2.6)	平年並	(116)	少ない	(72)
	中旬	かなり高い	(3.3)	多い	(121)	平年並	(100)
	下旬	高い	(1.5)	平年並	(78)	平年並	(119)
4	上旬	高い	(1.3)	少ない	(42)	少ない	(76)
	中旬	平年並	(-0.4)	多い	(130)	平年並	(109)
	下旬	高い	(0.7)	平年並	(64)	多い	(126)
5	上旬	低い	(-0.6)	平年並	(67)	多い	(128)
	中旬	かなり高い	(1.8)	かなり多い	(368)	かなり少ない	(19)
	下旬	低い	(-0.7)	多い	(167)	平年並	(85)
6	上旬	高い	(0.4)	多い	(132)	平年並	(94)
	中旬	高い	(0.6)	平年並	(91)	少ない	(58)
	下旬	低い	(-0.6)	かなり少ない	(37)	多い	(152)
7	上旬	高い	(1.1)	平年並	(68)	平年並	(97)
	中旬	低い	(-1.0)	多い	(217)	平年並	(88)
	下旬	平年並	(-0.3)	少ない	(32)	少ない	(92)
8	上旬	平年並	(-0.1)	多い	(162)	平年並	(95)
	中旬	かなり低い	(-2.4)	かなり多い	(632)	かなり少ない	(12)
	下旬	平年並	(0.2)	少ない	(25)	多い	(131)
9	上旬	平年並	(0.3)	少ない	(33)	平年並	(107)
	中旬	平年並	(0.1)	多い	(227)	少ない	(69)
	下旬	高い	(1.6)	少ない	(36)	多い	(140)
10	上旬	かなり高い	(2.6)	少ない	(19)	かなり多い	(162)
	中旬	かなり高い	(1.8)	平年並	(68)	平年並	(95)
	下旬	かなり低い	(-1.8)	平年並	(60)	多い	(116)
11	上旬	平年並	(-0.5)	多い	(125)	平年並	(97)
	中旬	平年並	(-1.1)	少ない	(44)	平年並	(113)
	下旬	平年並	(-0.5)	多い	(155)	多い	(117)
12	上旬	低い	(-1.0)	かなり少ない	(7)	かなり多い	(151)
	中旬	平年並	(0.4)	平年並	(122)	多い	(123)
	下旬	低い	(-0.7)	少ない	(27)	少ない	(91)

表1. 2021年九州南部地域における気温,降水量および日照時間の旬別階級区分.

### 2)赤潮の防除・被害軽減手法の開発

# 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,秋田一樹,堀田卓朗

水産研究・教育機構 水産技術研究所(廿日市)

湯浅光貴,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

水産研究・教育機構 水産大学校

山﨑康裕

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

野田誠, 宮村和良

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

北里大学 医学部

西槇俊之, 勝村啓史, 小川元之

### 1 全体計画

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3年度計画及び結果

<sup>(1)</sup> 目的

(1) 目的

全体計画と同じ。ただし、本年度は調査準備を進めていた海域の一部(大分県海域)において Karenia mikimotoi 赤潮が発生しなかったため、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)

これまでに、*Chattonella*において魚毒性やスーパーオキシドレベルが株間で大きく異なる ことが分かっている。その原因を追究することで新たな魚毒性診断手法を見出す可能性があ る。18S rDNA の系統解析や NADPH オキシダーゼ (NOX)の変異解析を行い、強毒株あるい は弱毒株の遺伝子配列の差異を指標としたグループ分けを試みた。18S rDNA 遺伝子の系統解 析は Shikata et al. (2021)の方法に準じて実施した。Molecular Evolutionary Genetic Analysis software (MEGA7)を用いて、*Chattonella* 株や他のラフィド藻類などの 18S rDNA について、 Maximum-likelihood (ML)法により分子系統樹を作成した。Bootstrap の信頼性は 100 回繰り 返しによる Bootstrap test で評価した。

次に, *Chattonella* Ago03株(強毒), Ago04株(弱毒), NIES-1株(強毒), 4KGY株(弱 毒)の RNA-seq データを用いて, 7種類の NOX 遺伝子について株ごとの変異箇所を同定し た。各遺伝子に複数存在するアイソフォームの違いを吸収するため, RNA-seq アセンブリに 用いた Trinity プログラムに付属するツールを用いて, 遺伝子ごとにユニークな配列を一本に つなげた SuperTranscript を作成した。これに対して, STAR を用いて各リードについてスプラ イシングを考慮したマッピングを行い, GATK の HaplotypeCaller を用いて変異の抽出を行っ 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

これまでに一部の有害赤潮の貝類に対する毒性はシオミズツボワムシ(以下,ワムシ)に 対する毒性や溶血活性と相関する可能性が示されている。本課題では,ワムシへの毒性や溶 血活性の原因となる毒物質の物性の絞り込みを行うとともに,簡易アッセイ系を現場適用す るために必要な科学的根拠の収集を行った。

①異なる光および栄養塩条件下におけるワムシへの毒性,溶血活性,貝類への毒性診断法の検証(水技研[廿日市],北里大)

令和2年度までに、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3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 類へのアッセイを行うことで、毒性が高まる培養条件の特定を試みた。貝類への毒性は生残 率、へい死までに要する時間から診断した。

まず,改変 SWM-3 培地(完全培地),25℃,250 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>,12 hL:12 hD(6:00–18:00 明)の条件で継代培養した *K. mikimotoi* 培養株(Km69-9ax;無菌)を用いて,ワムシへの毒性と溶

血活性の相関関係を調べた。K. mikimotoi を異なる光強度(0, 50, 100, 250, 500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 4日間),もしくは栄養条件(滅菌ろ過海水で洗浄後,完全培地,N無添加培地[改変 SWM-3 培地成分から硝酸塩を除去], P 無添加培地 [改変 SWM-3 培地成分からリン酸塩を除去];6 日間)で培養した後、ワムシアッセイおよび溶血活性計測を実施した。ワムシアッセイにつ いては,48 ウェルプレート (IWAKI) を用いた紫加田ら (2020) の方法に従い,25℃,100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>で7~9日間培養したシオミズツボワムシ(国立研究開発法人水産研究・教育機構のジ ーンバンク事業を通じて恵与 ; L 型奄美株)を試験に供した。ワムシを実体顕微鏡下で 10 個 体ずつウェルに収容後, K. mikimotoi の各培養液をそれぞれの培地で希釈して 1.0×10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>になるように調整し、各ウェルヘK. mikimotoi 培養液を添加後、6時間静置した。暴露条 件は 25°C, 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>とし,暴露開始直後と暴露後 2,4,6時間にワムシを光学顕微鏡下 で観察して生死を判別した。溶血アッセイはウサギの保存血(株式会社日本バイオテスト研 究所)は、受領後3日以内にクリーンベンチ内で2mL ずつ15mL 容チューブへ分注し、リ ン酸緩衝生理食塩水(以下, PBS)を8mL添加した後,均一に懸濁するよう静かに攪拌した。 その後,多目的冷却遠心機(CAX-371,株式会社トミー精工)を用いて遠心分離し(420×g, 10 分、4℃)、上清を取り除いた。また、上清が透き通るまで(最大 3 回)同様の洗浄を繰 り返し,洗浄した赤血球は終濃度が4%になるようにPBSに懸濁した。一方,各条件で得ら れた K. mikimotoi 培養液を 8.0×10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>になるように吸引濾過器で濃縮し, 丸底 96 試 験管へ1mL ずつ分注した。その後、4%の赤血球懸濁液を1mL ずつ添加し、25℃のインキ ュベーター内に静置した。30分おきに5時間,150 μLを1.5 mL 容マイクロチューブへサン プリングし,遠心分離(360×g, 10 分, 4℃)を行い,得られた各試料の上清 100 µL を平底 96 ウェルプレート(IWAKI)に気泡が入らないように注意して回収した。最後に、得られた 各試料上清の 480 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (MULTISKAN GO, Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いて測定した。なお、溶血活性の陽性反応区には、完全溶血を引き起こす Triton X-100 (富士フイルム和光純薬株式会社, Polyxyethylene(10)Octylpheny Ether)の4% 溶液(v/v)を用い、陰性対象区には改変 SWM-3 培地を用いた。また、試験区の溶血度は次 式より算出した。

溶血度(%)=(試料の溶血度 – 陰性対照区)/(陽性対照区 – 陰性対照区)×100

次に, *K. mikimotoi*の貝類への毒性とワムシへの毒性が相関するか否かを検証するために, メガイアワビに対して強い毒性を示すことが判明している *K. mikimotoi* 培養株 IMR04(有菌) を使用して(紫加田ら 2021),メガイアワビ稚貝およびワムシへの暴露試験を同時並行で実 施した。*K. mikimotoi* 培養株を異なる光条件(0,100,1,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)または栄養条件下(N および P 無添加培地)で4日間培養後,貝類およびワムシへのアッセイに供した。光条件別 および栄養条件別において,温度条件はそれぞれ 25°Cおよび 20°C,明暗周期はいずれも 12hL:12hD (6:00~18:00 明),栄養条件別の光強度は 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> に設定した。500 mL 容 トールビーカーに 500 mL の各種 *K. mikimotoi* 培養液(光条件: 4.5×10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>, N 欠, P 欠 条件:  $3.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>) および改変 SWM-3 培地(コントロール) を注入後,大分県栽培漁 業公社から購入したメガイアワビ稚貝(殻長 16.5±3.8 mm) 5 個体を収容し,通気しながら 24 時間暴露した。暴露開始直後, 3, 6, 12, 24 時間後にメガイアワビの生死観察と取り上げ, *K. mikimotoi* 細胞密度の計数,溶存酸素濃度(溶存酸素計: Multi3510IDS, WTW)の計測を 行った。ワムシのへい死は,繊毛や趾の運動が停止し,外部形態が角張り変形した状態と定 義した。同時に, *K. mikimotoi* 培養液を改変 SWM-3 培地で希釈後( $1.0 \times 10^2$  cells mL<sup>-1</sup>),ワム シへ 6 時間暴露した。なお,試験は全て 3 回繰り返し,得られたデータの統計解析は R3.6.2 を用いて実施した。

②ワムシへの毒性を指標とする魚介類への毒性診断法の現場検証(水技研[廿日市,五島], 埼玉大,大分水研,鹿児島水技,北里大)

試験を計画し準備を進めていた佐伯湾において K. mikimotoi による赤潮が未発生であったため,計画を遂行できなかった。

③溶血活性計測およびワムシアッセイによる貝類に対する K. mikimotoi 毒因子の物性解明(水 大校)

溶血活性およびワムシに対する毒性を指標として K. mikimotoi 毒因子の物性に関する情報 を収集することを目的とした。溶血活性試験は,紫加田ら (2020) の手順に従い 3 回繰り返 しにて実施した。まず,対数増殖後期 ( $1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>) の K. mikimotoi (IMR04 株) 培養 液をトラックエッチ・ヌクレポアメンブレンフィルター (孔径:  $3.0 \mu$ m, Cytiva) にて濃縮し, 高密度 ( $17 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>) の培養液を調製した。次に,濃縮した培養液の一部を 2 mL 容マ イクロチューブへ分注して遠心分離し (7940 × g, 5 分, 4°C),培養上清を回収して 2 種類の プロテアーゼ阻害剤 (6-Aminohexanoic Acid, 終濃度 1 mM,東京化成工業株式会社; Phenylmethanesulfonyl Fluoride,終濃度 1 mM,ナカライテスク株式会社) を添加した。一方, 上清を除いた細胞ペレットには新鮮な改変 SWM-3 培地と 2 種類のプロテアーゼ阻害剤を添 加した後,超音波砕波機 (株式会社トミー精工,UR-21P)を用いて細胞を完全に破砕した。 これらの試料は、U 底 96 ウェルプレート (Dickinson and Company, Becton) の各ウェルへ 80 µL ずつ添加した。その後,洗浄して終濃度が 4 %になるように PBS に懸濁したウサギの赤血 球懸濁液 (株式会社ジャパン・バイオシーラム)を 80 µL ずつ添加し, 25°C, 12hL:12hD, 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>のインキュベーター内に静置した。また、数種の鞭毛藻類から光依存性の溶血活 性物質が見出されていることから (Miyazaki et al. 2005; Kuroda et al. 2005),本試験では遮光の 有無による反応の差異についても検討を行った。

5時間の反応後,遠心分離(360 × g, 10 分, 4°C)を行い,得られた各試料の上清 80 µL を測定用平底 96 ウェルプレート(Dickinson and Company, Becton)に気泡が入らないように 注意して回収した。最後に,得られた各試料の上清における 480 nm の吸光度をマイクロプ レートリーダーによって測定した。なお,溶血活性の陽性反応区には,完全溶血を引き起こ す Triton X-100 の 2%溶液(v/v)を用い,陰性対照区には改変 SWM-3 培地を用いた。また, 試験区の溶血度は上述の式より算出した。

ワムシアッセイは、紫加田ら(2020)の手順に従い3回繰り返しにて実施した。まず、K. mikimotoiのワムシ(上述のL型奄美株)に対する半数致死濃度を算出するために、異なる細 胞密度の K. mikimotoi 培養液がワムシの生残に与える影響を調べた。48 ウェルプレート

(Corning)の各ウェルに改変 SWM-3 培地 0.1 mL を添加した後,25℃,塩分 30 にて7~10 日間培養したワムシを 0.1 mL あたり 10 個体になるようピペットで採取して添加した。その 後,暴露密度が 10~10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>となるよう調整した *K. mikimotoi* (IMR04 株)の培養液を 0.8 mL ずつ添加し,各ウェルの最終液量を 1 mL とした。また,改変 SWM-3 培地のみにワムシ を収容し,対象区とした。48 ウェルプレートは,25℃,12hL:12hD,200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>のインキ ュベーターにて静置し,暴露開始から 60 分間隔でワムシのへい死個体数を顕微鏡下で計数し て生残率を算出するとともに,統計ソフト (R3.6.2)を用いて暴露開始 2 時間目における半数 致死濃度を算出した (Ritz 2010)。

本種が有する毒因子の物性を明らかにするために, K. mikimotoi 培養液の凍結融解試料がワムシの生残に与える影響を調べた。対数増殖後期( $1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)の K. mikimotoi 培養液をトラックエッチ・ヌクレポアメンブレンフィルターにて濃縮し、高密度の培養液( $25 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)を調製した。その後、濃縮した培養液に2種類のプロテアーゼ阻害剤を添加し、使用まで-20℃にて冷凍保存した。ワムシアッセイは、前述と同様の手順で実施した(暴露密度:10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>、最終液量:1 mL)。なお、K. mikimotoi の毒因子はプラスチック吸着性を有することが考えられたため、本試験では試料の冷凍保存や暴露試験にはガラス製の遠沈管や24 ウェルプレートを使用した。

本種が有する毒因子の毒因子の化学的性状および局在部位を明らかにするために、様々な 暴露条件下でワムシアッセイを実施した。まず、対数増殖後期( $1.3 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)の *K. mikimotoi* 培養液の一部を 2 mL 容マイクロチューブへ分注して遠心分離し(7940 × g, 5 分, 4°C)、培養上清を回収した。また、上清を除いた細胞ペレットには新鮮な改変 SWM-3 培地 を添加した後、超音波砕波機を用いて細胞を完全に破砕した。さらに、対数増殖後期( $1.3 \times 10^4$ cells mL<sup>-1</sup>)の *K. mikimotoi* 培養液の一部を 2 mL 容マイクロチューブへ分注し、100°C、10 分 の加熱処理を行った。一方、*K. mikimotoi* の毒性発現に標的との接触が必要か否かを明らかに するために、セルカルチャーインサート(孔径: $3.0 \mu$ m, Corning)を用いた非接触条件(イ ンサート内側:ワムシ 10 個体、インサート外側:*K. mikimotoi* 1.0×10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>)でのワム シアッセイを実施した。これらの培養液,培養上清,細胞破砕液,加熱処理した培養液および非接触条件でのワムシアッセイは,24ウェルプレートを用いて前述と同様の手順で実施した(暴露密度:1.0×10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>,最終液量:2 mL)。

これまでに、貝類に対して強い致死作用を示すことで知られる渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の毒因子として、タンパク質の関与が示唆されている(Kim et al. 2000a; 松山 2003)。本研究では、*H. circularisquama* に関する先行研究(Kim et al. 2000a; 松山 2003)に従 い、遊泳能力を阻害しない濃度でトリプシン処理を行った *K. mikimotoi* 細胞をワムシに暴露し た。まず、対数増殖後期( $1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)の *K. mikimotoi* を改変 SWM-3 培地にて希釈し、  $5.0 \times 10^2$  cells mL<sup>-1</sup>の培養液を調製した。次に、終濃度が 25、50 および 100 µg mL<sup>-1</sup> となるよ うにトリプシン溶液(ウシ膵臓由来、富士フイルム和光純薬株式会社)を *K. mikimotoi* 培養液 に添加し、25℃、12hL:12hD、200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の条件にて 2 時間静置した。その後、48 ウェル プレートを用いたワムシアッセイを前述と同様の手順で実施した(暴露密度:  $1.0 \times 10^2$  cells mL<sup>-1</sup>、最終液量: 1 mL)。なお、トリプシン処理の対照区には、100℃、10 分で加熱処理した トリプシン溶液を用いた。

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 Chattonella 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 と相関することが知られている(Shikata et al. 2021)。本研究は、現場赤潮海水の活性酸素濃 度(相対値)により魚毒性を推定する手法を確立すること、将来の円滑な現場普及を目的と して、その手法に対して科学的根拠を付与することを目的とした。

①現場におけるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 計測法の確立と検証(水技研 [廿日市,五島],鹿水技,大分水研)

人代海において Chattonella 属の赤潮発達の報告を受け、東町漁業協同組合に供試魚の準備 や用船などのご協力を頂いて、ブリを用いた現場赤潮海水の暴露試験を行った。2021年7月 16,17,19~22日の朝、薄井近辺の東町漁協管内で水揚げされた当歳(尾叉長約300 mm,体重 約350g、事前に1~2日間餌止め)もしくは2歳の養殖ブリ(全長約570 mm,約2,320g、事 前に3日間餌止め)を購入し、調査船(東町漁協所有の「第十八鰤王丸」)の活け間で北部 の赤潮発生海域まで輸送した。船上検鏡しながら、Chattonellaの細胞密度の異なる地点にお いてバケツで表層採水を行い、500L 容のパンライト水槽に8割程度の赤潮海水を満たした。 L-012(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた O<sub>2</sub>-レベル計測、エアーのセット、種々の 水質計測を行った後、当歳の場合ブリを25尾、2歳の場合ブリを2尾ずつ投入した。暴露開 始6時間後まで、生死観察を行った。O<sub>2</sub>-レベル計測の手順は以下の通りとした。

1. 100 μm 目合いのふるいで大型の発光生物を除去

2. そのまま発光計測

3. L-012 を添加して発光計測

4. L-012 および SOD (富士フィルム和光純薬株式会社)を添加して発光計測

5. 3と5の差を取り, **O**<sub>2</sub><sup>-</sup>レベルを算出

なお,2で大きな発光が検出された場合は発光生物の混入を疑って解析対象から除外したが, 今回の調査でその該当となったのは1サンプルのみであった。

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 Mn イオン濃度の影響(水技研・五島)

これまでの研究により、*Chattonella* の  $O_2^-$ 産生レベルには培地成分が多大に影響し,窒素や リンの枯渇が魚毒性を高めることを突き止めた。また、Mn イオンは  $O_2^-$ レベルを低下させる 作用があり、現場と室内間で *Chattonella* を含む海水の  $O_2^-$ レベルに大きな差を生む原因と考 えている(Yamasaki et al. 2022)。しかしながら、Mn 濃度が低下して  $O_2^-$ レベルが上昇した場 合に魚毒性が高まるか否かについては未検証である。そこで、改変 SWM-3 培地(完全培地) および MnCl<sub>2</sub>を成分から抜いた改変 SWM-3(Mn 無添加培地)で培養した *Chattonella* をブリ 当歳魚に暴露し、魚毒性と  $O_2^-$ レベルの関係を比較した。Mn 無添加培地での培養は、Mn 無 添加培地で前培養したものを試験に用いた。*Chattonella* の培養条件は、温度 22.5℃、12 hL:12 hD、明期 6:00~18:00、照度 400 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>に設定した。*Chattonella* の培養株は、比較的魚毒 性の高い NIES-1(無菌)および Ago03(有菌)を実験に供した。ブリは 22℃で飼育され、半 日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 5 L を 入れ、ブリ(平均体長 14 cm、平均体重 26 g)を 5 尾ずつ収容して通気した。*Chattonella* の 細胞密度は培養原液を濾過海水で希釈して 1,000~1,500 cells mL<sup>-1</sup>に調整した。希釈後の培養 液については、L-012 を用いた化学発光法により  $O_2^-$ レベルを計測した。暴露試験は最長 8 時 間行い、ブリの生死および溶存酸素濃度(6 mg L<sup>-1</sup>以上)を監視した。

## イ. NADPH オキシダーゼの定量法の確立(埼玉大)

#### A. ペプチド抗体を用いた NOX の検出

Chattonella の RNA-seq 解析から 7 つの NOX 候補遺伝子が推定されている。昨年度,転写 産物量と魚毒性に相関がある NOX23465 遺伝子,転写産物量の多い NOX21661 遺伝子および NOX25216 遺伝子に着目して,これらの遺伝子産物に特異的なペプチド抗体の作製をユーロ フィンジェノミクス社に依頼し,得られた抗体で Chattonella の NOX タンパク質の検出を試 みたが,NOX は検出できなかった。そこで,本年度は NOX25216 遺伝子に特異的なペプチド 抗体の作製をコスモバイオ社に依頼した。得られたペプチド抗体を用いて,Chattonella のス ーパーオキシド産生が高い強毒株 NIES-1 および Ago03,スーパーオキシド産生が低い弱毒株 Ago04 で NOX の発現を解析した。細胞を 25℃,12hL:12hD,明期 6:00~18:00,250 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> で継代培養した。両株を初期細胞密度 2,000 cells mL<sup>-1</sup>で植え継ぎ,2 日間培養した後,遠心分 離 (3,000 rpm, 4℃, 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砕し, 遠心分離 (15,000 rpm, 4℃, 5 min) した後, 膜画分を得た。膜画分を SDS の添加と加熱 (90℃, 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。NOX25216 に特異的なペプチド抗体を用いてウエスタンブロッティング法で NOX タンパク質を検出し た。その際,免疫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。なお実験はそれぞれ 3 回以上行った。

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

*Chattonella* 細胞の O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生が NOX 由来であることを確認するために, 動植物で効果が実証 されている NOX 阻害剤 Diphenyleneiodonium (DPI) (終濃度 5  $\mu$ M) またはその溶媒である Dimethyl sulfoxide (DMSO) の投与試験を実施した。DPI の存在下で 1 時間インキュベート した強毒株 (Ago03) および弱毒株 (Ago04) から上記の方法で膜画分を調製し, 2% β-Dodecyl maltoside (同仁化学) で穏やかに膜タンパク質を可溶化後, そのまま Clear Native-PAGE (100 V, 10 mA, 2 h) に供して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<sub>2</sub><sup>-</sup>産生活性の検出には, Sagi and Fluhr (2001) を参考に Nutrobulue tetrazolium (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<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH7.4)) に浸し, 暗所で 20 分間振とうした。200  $\mu$ M NADPH を添加して, 暗所で 30 分間振とう後, O<sub>2</sub><sup>-</sup>を青色の NBT 染色バンドとして検出した。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。

① LC/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 分析を行い, 強毒株(Ago03)と弱毒株(Ago04)の比較を行った。また, Chattonella 強毒株(Ago03)お よび K. mikimotoi 強毒株(IMR04)を暴露したブリから鰓を採取し,脂質を抽出後,LC/MS および薄層クロマトグラフィーに供した。ブリへの暴露試験は3)②と同様の方法で行った。 さらに,毒性の異なる複数株の K. mikimotoiのメタノール抽出液について,ノンターゲット分 析を行い,魚介類の毒性と相関する化合物群について,毒性の異なる株間で比較した。

②魚毒性と糖含有量の関係把握(水技研 [廿日市], 埼玉大)

有害赤潮プランクトンが有する細胞外多糖(グリコカリックス)は粘性の原因となり,魚毒性に関与すると考えられている。これまでの研究により,栄養塩が枯渇すると, *Chattonella* 

の魚毒性が上昇することが明らかとなり,魚類の鰓への細胞付着量が上昇する可能性がある。 令和3年度は, *Chattonella*の粘性と関与しうる糖含有量や糖組成を把握するために分析を行った。まず,毒性の異なる *Chattonella* 培養株4株(強毒:NIES-1, Ago03,弱毒:4KGY, Ago04) の糖組成分析を行った。細胞ペレットを凍結乾燥器で濃縮し,糖濃度の計測結果を踏まえて 全糖濃度が1mg mL<sup>-1</sup>となるように蒸留水に再懸濁した。懸濁液に当量の2Nトリフルオロ酢 酸(TFA)を加え,オートクレーブで120℃,60分間の加水分解処理を行い,遠心エバポレ ーターで TFA を除去した。得られた糖の加水分解産物を high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (Dionex ICS-5000+, Thermo Fisher Scientific) に供して、単糖(フコース,ラムノース,アラビノース,ガラクトース,グルコース,マンノ ース,キシロース,ガラクツロン酸,グルクロン酸)の検出を行い,各単糖のモル濃度比を算 出した。

次に, 鰓と直接接触すると考えられるグリコカリックスを *Chattonella* の強毒・弱毒株およ び異なる栄養条件で培養した細胞から回収し, 糖含有量の定量を行った。株別実験には Ago03 および Ago04, 栄養条件別実験には無菌株 4KGY を使用した。両実験ともに、培養の温度お よび光の条件は 25℃および 12 hL:12 hD (6:00~18:00 明), 250  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>に設定した。栄養 条件別実験においては, 改変 SWM-3 培地 (完全培地), N 無添加培地, P 無添加培地で培養 株を 6 日間培養後, グリコカリックスの単離に供した。グリコカリックスの単離および糖サ ンプルの作製は Kim et al. (2000b) と Shikata et al. (2021) に従って,以下の手順で行った。

- 1. 150 mL の培養液を 50 mL 容 TPX チューブ 3 本に分注し,超音波破砕機(UR-20P,株式会社トミー精工)の最小出力(Power control: 0)で撹拌。
- 2. 800×g 4℃で 5 分間遠心分離。
- 上清(グリコカリックス画分)を限外濾過フィルター(Biomax 300 kDa PBMK07610, Merck Millipore)をセットしたアミコン濃縮機(UFSC40001, Merck Millipore)に入れ,液量が1 mL以下になるまで濃縮。
- グリコカリックス画分および細胞画分(2.の沈殿物)に9倍量の100%エタノールを添加し、4℃で2時間以上静置した後、12,000×g,4℃で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄。
- 5. 各画分をそれぞれ 500 μL のメタノール: クロロホルム=3:2, 100%エタノール, 80%エタ ノール, 60%エタノール, 100%エタノールで2回ずつ洗浄。
- 遠心エバポレーター(株式会社トミー精工)を使用して 60℃で1時間乾燥後,500 μLの 蒸留水に溶解。

得られた各画分の糖抽出液の全糖濃度をフェノール硫酸法で定量し、細胞あたりの糖含有量 を算出した。

5)赤潮に暴露された魚介類の組織学的解析の手法検討(北里大,水技研[五島])

養殖魚の赤潮による病変の特徴を解明し、それを診断する技術は、我々が開発した魚毒性 診断技術を現場で実証する際に必要となる。この技術を確立するために残されている課題の