

(2) 新たな赤潮原因プランクトン水産生物に対する毒性の影響等の調査
ア. 北海道太平洋沿岸に発生した赤潮原因プランクトンの種同定と
生理生態特性の解明

【担当機関・所属・担当者】

水産機構水産技術研究所：坂本節子、中山奈津子、外丸裕司、湯浅光貴、紫加田知幸
水産機構水産資源研究所：渡辺剛、谷内由貴子
道総研釧路水産試験場：安東祐太郎
道総研中央水産試験場：有馬大地
東京大学（再委託）：岩滝光儀、高橋和也

【目的（全体計画）】

令和3年9月に北海道東部太平洋で発生した赤潮は、サケ類やウニ類など有用水産生物の大規模なへい死を引き起こし、令和3年12月現在、80億円を超える甚大な漁業被害をもたらしている。赤潮の主体は *Karenia selliformis* であることが確認されているが、我が国において本種による赤潮の発生は初報告であり、我が国の沿岸環境下における生態や増殖生理特性については知見がない。赤潮による漁業被害を軽減するためには、早急に原因プランクトンの実態や特性を把握し、赤潮の発生メカニズムを解明するとともに対策が求められている。本課題は、赤潮原因プランクトンの生物学的特性を明らかにすることを目的とする。北海道太平洋沿岸で発生した赤潮原因プランクトンの種組成や構成種の形態および分子分類学的特徴を明らかにする。また、赤潮原因プランクトンの培養株を確立して室内培養実験系を構築し、増殖生理特性の把握、細胞形態に及ぼす環境の影響、シストの存在有無などの生活史の把握を試みる。

【方法】

1) 赤潮原因プランクトンの分類学的検討

海水試料に含まれるカレニア科渦鞭毛藻を単離して単藻培養株を作成し、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いた形態観察、そして ITS と LSU 領域の rDNA に基づく分子系統解析を実施した。赤潮構成種を把握するために 2021 年の赤潮試料、その後の赤潮モニタリングに利用する出現種情報を得るために 2022 年の海水試料を用いた。

2) 種同定手法の開発

①化学固定法および検鏡による種判別手法の開発

培養株を用いて *K. selliformis* の最適な化学固定法を検討した。検討に用いた固定液は、1) グルタルアルデヒド [終濃度 1%、以下 GA]、2) パラホルムアルデヒド [終濃度 1%、以下 PFA]、3) ホルマリン [終濃度 1%、以下 FA]、4) 片野固定液 [Katano et al. 2009 参

照]、5) 改変片野固定液 [固定剤は GA のみ、緩衝液や浸透圧調整試薬の組成が異なる。ここでは嶋田液と呼称]、の 5 種類を用いた。培養株で得られたデータを基に、野外試料でも FA を除く上記の固定液に、ルゴール終濃度 1% を追加した 5 種類を用いて、*K. selliformis* を観察した。

Karenia selliformis と近縁種 (*Karenia mikimotoi* と *Karenia longicanalis*) は核の位置で種判別できる (Iwataki et al. 2022)。片野固定液で固定した *K. selliformis* と *K. mikimotoi* の培養株を DAPI 染色で蛍光観察 (UV と BV 励起) し、核の位置や形態を確認した (以下、DAPI 観察)。その後、野外試料において混在する形態類似種の識別を実践した。野外試料は 2021 年 9 月 19 日から現在まで継続しているモニタリング試料 (釧路市東部の桂恋漁港口と漁港内東側、釧路庁舎の飼育用の取水の 3 点) の一部を用いた。

②LAMP 法等による簡易種同定・検出手法の開発

2021 年 9 月に北海道太平洋沿岸で発生した *K. selliformis* 赤潮海水から分離した、複数培養株の LSU rDNA D1-D2 領域の遺伝子配列情報をもとに *K. selliformis* 種特異的な配列を検出の標的とした LAMP 法プライマーを設計した。設計には Primer Explorer Ver.5 (FUJITSU Solution) を用い、ループプライマーを含む 6 本の LAMP 法プライマーを作製した。得られたプライマーを用いて LAMP 法による検出の至適温度や反応時間、検出限界 DNA 抽出濃度を検討した。これらの検討には *K. selliformis* 培養株 (北海道厚岸産 21Ks11 AK 株および青森県平内産 MoKr600 株) を 5% Chelex DW で加熱抽出 (99.9°C、10 分) した DNA 粗抽出液 (10 cells 200 μL^{-1}) およびその段階希釈液を用いた。LAMP 法の分析にはリアルタイム濁度検出器 Loopamp LA-200 (栄研化学) および Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いた。

本 LAMP 法の標的遺伝子である *K. selliformis* の LSU rDNA D1-D2 領域を PCR 増幅、精製した DNA 断片をもとに既知コピー濃度の LAMP 法用標品を作製した。検出限界については本標品の段階希釈液を用いて検討し、LAMP 法による検査の際の適切な標品濃度を決定した。

3) 環境 DNA による赤潮原因プランクトン分布情報の収集

2021 年に北海道太平洋沿岸で発生した赤潮原因プランクトンの分布や種組成について、広く情報を収集することを目的とし、環境 DNA 解析技術を用いて網羅的解析を実施することとした。解析に用いる遺伝子領域を決定し、それに基づいて、2021 年の赤潮発生前や発生時期の海水から得た環境 DNA を解析し、生物組成について評価した。海水試料は、2021 年 3 月から 9 月まで水産機構水産資源研究所釧路庁舎 (以下、北水研) 取水から得られた海水 6 サンプル、道東から道南の沿岸域で得られた海水 14 サンプルを解析に供試した (表 1)。海水試料はバケツを用いて採取し、そのうち 200~1000 mL を Sterivex HV フィルター (0.45 μm (Merk Millipore, Germany) 内に濃縮することで粒子を回収し、RNA later

™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を 2 mL 加えた後、保冷剤を入れた発泡スチロールボックスに入れて研究室に持ち帰り、解析まで冷凍保存した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, CA, U.S.A.) を用いて DNA を抽出し、メタバーコーディング解析を生物技研 (株) に依頼した。ブラスト検索については信頼性の高い手法 (長井ら; 2023 年 GitHub で公開予定) を用いて行い、得られた群集データを Hellinger 変換後、Bray-Curtis 非類似度で距離行列を作成し、Ward 法で階層的クラスタリングを実施した。

4) 培養株の維持培養方法と大量培養系の確立

2021 年秋の北海道赤潮海水より分離した *K. selliformis* 培養株を健全な状態で維持し、暴露試験などに供する大量培養を準備するために、増殖に及ぼす培地や培養容器の影響を調べた。2021 年 10 月末に確立した培養株を 20°C、12 hL : 12 hD、150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、改変 SWM-3 培地 (紫加田ら 2011) を 25 mL 含む 50 mL 容ガラス製三角フラスコで継代培養した。その後、同じ温度および光の条件下で、0.5 L、1 L、2 L の培地を含む 2 L ガラス製メジウム瓶および培地 5 L を含むウナギ仔魚飼育用ボール (アクリル製、透明) にて本種を培養し、細胞密度の推移を追跡した。

5) 増殖生理特性の解明

①水温・塩分・光強度が増殖速度に及ぼす影響の把握

2021 年 10 月に釧路沿岸で採水した赤潮海水から単離した *K. selliformis* 培養株 (Ks-1, Ks-6, Ks-13 株) を改変 SWM-3 培地中、12 hL : 12 hD (明期 6:00–18:00, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、塩分 33 の条件のもと、異なる温度 (5, 10, 15, 17.5, 20, 22.5, 25°C) で 14 日間馴致培養を行った。その後、各温度の培養液を異なる塩分 (15, 20, 25, 30, 33) に調整した培地に接種し、15 日間培養した。2 日に 1 回 *in vivo* クロロフィル *a* 蛍光値を測定し、紫加田ら (2011) に従って、最大増殖速度 (div. day^{-1}) および最大細胞密度 (cells mL^{-1}) を算出した。また、20°C、塩分 33、12 hL : 12 hD (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の条件で培養した *K. selliformis* の 3 株を 1 日間暗処理した後、異なる光強度 (0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 250, 400, 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に移して培養した。各培養株の細胞密度を培養開始後 10 日間計数し、紫加田ら (2011) に従って、最大増殖速度 (div. day^{-1})、増殖に必要な最小光強度 (I_0)、半飽和定数を算出した。実験は全て 3 回繰り返して実施した。

②細胞の大きさや色素量の変化に与える環境要因の検討

100 mL ガラス製三角フラスコに 60 mL の f/2 培地を入れ、18°C、光強度 500–600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12h:12h 明暗周期) で当該種 21KS11 株の培養を行った。細胞の計数・サイズ測定は Tali イメージサイトメーター (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。培養液 100 μL に対して 1% GA 水溶液を 1/100 量添加し、直後に計測を実施した。

6) 生活史の把握

海底泥中における *K. selliformis* のシストの存在を調べるために、赤潮発生期間 (2021 年 10 月、11 月) および非発生期間 (2022 年 1 月) の海底泥を用いて、栄養細胞発芽試験を行った。用いた試料は、表 2 の通りである。試験方法は次の通りである。10°C 暗所で保存していた海底泥を葉さじで 1 分間泥が均一になるようよく混ぜたあと、1 g 測り取り、10 mL の SWM-3 培地に加え (final 0.1g mL⁻¹)、超音波で 1 分間処理した。発芽試験は、48 ウェルマイクロプレートを用いて終点希釈法 (Imai et al. 1984) により行い、水温 15°C、光強度は 50 または 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、GeO₂ 添加または無添加の条件でインキュベータ内で実施した。培養期間は 8 日間で、2 日に 1 度顕微鏡下で発芽細胞の有無を観察した。最終観察日 (8 日目) は、上清を抜き取り観察した。さらに、GeO₂ を添加しなかった区に関しては、珪藻類の種類を観察した。

2021 年 9 月に厚岸湾および釧路市桂恋漁港で採集した海水から *K. selliformis* を 48 ウェル培養プレートに単離した。増殖したウェルについて培養液の一部を培地 (f/2+現地海水 1:1) に添加して培養株を立ち上げるとともに、残りの培養液を 48 ウェルまたは 24 ウェルの培養プレートに移し、培地を適量足して 10°C または 15°C、で培養し、シスト様細胞および葉緑体が消失した細胞の出現の有無を不定期に観察した。

【結果および考察】

1) 赤潮原因プランクトンの分類学的検討

2021 年の赤潮試料からは優占種である *Karenia selliformis* のほか、*Karenia longicanalis*、*Karenia mikimotoi*、*Karlodinium* sp.、*Takayama* cf. *acrotrocha*、*Takayama tuberculata*、*Takayama* sp. の出現を確認した (Iwataki et al. 2022)。これらのうち、*K. selliformis*、*K. longicanalis*、*K. mikimotoi*、*T. cf. acrotrocha*、*Takayama* sp. の培養株が確立できたため系統的位置を確認した。2021 年の道東赤潮の原因となった *K. selliformis* の ITS と LSU rDNA 配列は 2020 年にロシア・カムチャツカに発生した赤潮試料の *K. selliformis* のものと一致し、これらは種内系統群 I に含まれた (Iwataki et al. 2022; Orlova et al. 2022)。また、これらは 2018 年に青森県より分離した *K. selliformis* (系統群 II) とは種内での系統的位置が異なっていた (Iwataki et al. 2022)。2021 年の道東赤潮中に確認された *Karenia* の 3 種の形態形質を比較したところ、核の位置、葉緑体の形状と数が 3 種の識別に有用であることが分かった。2021 年の赤潮試料において、葉緑体が減少あるいは消失した *K. selliformis* や油球を持った *K. selliformis* の出現を確認するなど、本種の形態が多様であることがわかった。出現環境条件や本種の生活環と、これらの細胞の出現との関係についてはさらに調査研究が必要である。なお、副次的研究成果物として、観察したカレニア科渦鞭毛藻の写真を整理して種同定の参考となる資料を作成し、本事業のモニタリング担当関係者間で情報を共有した。これにより、モニタリングにおいて細胞形態による種同定をより正確に実施

するための基盤が構築された。

観察した 2022 年の海水試料からは *K. selliformis* の細胞は確認されていない。カレニア科渦鞭毛藻は、*Karenia cf. longicanalis*、*K. mikimotoi*、*Karlodinium sp.*、*Takayama sp.* の 4 種の出現が確認された。*K. cf. longicanalis* は 2021 年に出現した *K. longicanalis* とは系統的位置が異なり、核の位置も *K. longicanalis* とは異なるため未記載種であると考えている。*Karlodinium sp.* は系統的に *K. digitatum* と近縁であり、2021 年に出現が確認された *Karlodinium sp.* とは横溝の交差の程度と上錐溝の長さが異なるため、これとは別種である。また、*Takayama sp.* は 2021 年の赤潮中に確認された *Takayama sp.* とは形態形質と系統的位置が一致したため同種であると考えている。有害赤潮モニタリングを道東沿岸でより正確に実施するためには、これらの未記載種の記載や未同定種の同定を進めることで、カレニア科渦鞭毛藻の種組成を把握する必要がある。

2) 種同定手法の開発

①化学固定法および検鏡による種判別手法の開発

各種固定液で *K. selliformis* 培養株の固定後、細胞を観察したところ、片野固定液を除く固定液では著しい原形質分離や色素凝集などが見られた。片野固定液はわずかな原形質分離を生じたものの、生細胞とほぼ同様の形態を保持した (図 1)。野外試料の形態観察でも片野固定液が概ね形態を維持し、追加したルゴールは着色により色素観察が困難であった。これらの結果から固定液は片野固定液を選定した。培養株の DAPI 観察では *K. selliformis* の特徴である核が下錐に存在することと、*K. mikimotoi* についても核は半身 (左部) に位置することを確認した。赤潮期間中の野外試料の DAPI 観察では同所的に出現した *K. selliformis* と近縁種を識別でき、定常期に単独で出現したカレニア様細胞についても DAPI 観察で種同定できた (図 2)。よって、*K. selliformis* 赤潮では (1) 片野固定液による固定、(2) DAPI 観察による種判別、がモニタリングに有効な手法であると考えられる。

②LAMP 法等による簡易種同定・検出手法の開発

作製した LAMP 法プライマーを用いて *K. selliformis* の北海道株および青森株とともに検出できることを確認した (図 3)。Iwataki et al. (2022) は *K. selliformis* に 2 つの種内系統群が存在し、北海道株は系統群 I、青森株は系統群 II に分類されることを報告している。このことから、作製した LAMP 法では *K. selliformis* の両系統群を検出することが可能である。LAMP 法の反応至適温度は 62~64°C であった。これらの温度帯では反応時間に差は認められなかった。*K. mikimotoi* を含む他種渦鞭毛藻 14 種および有害ラフィド藻 4 種は本 LAMP 法では検出されなかった。また、既存の *K. mikimotoi* を検出する LAMP 法では *K. selliformis* は検出されなかった。*K. selliformis* (21Ks11 株) の DNA 粗抽出液 (10 cells 200 μL^{-1}) とその段階希釈液 (0.001~1 cell 200 μL^{-1} 相当の 4 段階) および既知コピー濃度の段階希釈液 ($2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^6$ copies μL^{-1} の 7 段階) を分析した結果、それぞれ 0.001

cells $200 \mu\text{L}^{-1}$ および $2 \times 10^2 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ の濃度までを 60 分以内に検出可能であった(図 4 : 既知コピー濃度の段階希釈のみ掲載)。また、検出時間は DNA 粗抽出液あるいは既知コピー濃度の段階希釈液の濃度に比例して早くなることから、本 LAMP 法はある程度定量的な出現の推定にも利用可能であると推察された。一方で、非常に高感度でごくわずかな標的 DNA の存在も検出してしまうことから、実際の現場試料での検出と生きた細胞の存在との関係については慎重な判断が必要となる。

以上の結果から、LAMP 法を用いて *K. selliformis* を種特異的、かつ高感度、短時間に検出できる手法が確立できた。本 LAMP 法は *K. selliformis* と *K. mikimotoi* を遺伝子検査で判別する際に有効な手法となると期待される。一方、本 LAMP 法は定量的な検出も可能であることが確認できたものの、極低濃度の *K. selliformis* 標的遺伝子を検出可能であることから、その活用方法についてはさらなる検討が必要と考える。

3) 環境 DNA による赤潮原因プランクトン分布情報の収集

① 解析領域の検討

環境 DNA 技術を利用した本解析に用いる領域やプライマーを決定するために、赤潮時期の試料(表 1 ●印)を用いて、18S rDNA および 28S rDNA についてメタバーコーディング解析を実施した。その後、得られた結果のリード数や配列に対してブラスト検索を実施した。その結果、18S では綱レベルの広範囲での生物分類を、28S rDNA では、種レベルでの把握が可能であるとの結果を得たため、今後は、18S rDNA および 28S rDNA を併用して解析し、環境中の生物組成を総合的に評価することとした。

② 18S rDNA 領域に基づく生物組成

結果①に基づき、北海道の道東から道南までの表層から採取した海水中のメタバーコーディング解析を行い、18S rDNA に基づく種組成を明らかにした。

まず、18S rDNA に基づいて生物組成を評価したところ、Dinophyceae の割合が 50%以上と多く、Bacillariophyta、Ciliophora と合わせて 80%以上を占める結果が得られた(図 5)。続いて、これらをクラスター解析した結果、得られた配列は概ね 3 つのグループに分けられた。グループ 1 は、北水研取水、グループ 2 は、桂恋漁港より東の海域、グループ 3 は桂恋漁港より西の海域から得られた配列で構成された。赤潮の非発生/発生観点からは、グループ 3 に赤潮期のサンプルのほとんどが含まれる結果となった(図 6)。一方で、グループ 1 に、北水研取水から採取された、2021 年 3 月から 9 月まで(非赤潮期から赤潮期)の配列が全てここに含まれることから、グループ 1 に関しては、何らかの要因が制限になっていることも推測された。

次に、得られた 3 つのグループの多様度、主要種について解析した。主要種については、高次分類、さらに、渦鞭毛藻類、珪藻、繊毛虫に分けて精査した。まず、多様度については、図 7 の多様度指数で示したように、グループ 1、2 の順で高く、グループ 3 は低かった。リード数はほぼ同程度であった。

主要種については、各グループを以下のように整理した。

ア) 高次の分類群で分類 (図 8) ; 多様度の高かったグループ 1 は、渦鞭毛藻・珪藻・放散虫・繊毛虫、グループ 2 は、珪藻・クリプト藻、グループ 3 は、渦鞭毛藻・繊毛虫で構成された。

イ) 渦鞭毛藻類 (図 9) ; グループ 1 では、3~9月初旬に採取した試料中の渦鞭毛藻の割合が低めで、*Amoebophrya*、*Alexandrium*、他などで構成された。9月下旬の赤潮期に入ると、*K. selliformis* が主要となった。グループ 2 は、*K. selliformis* の割合は低く、*Amoebophrya*、*Prorocentrum* など、多様な種で構成された。赤潮期のサンプルが比較的多く含まれるグループ 3 では、渦鞭毛藻の割合が高く、*K. selliformis* が優占種であった。

ウ) 珪藻類 (図 10) ; 高次分類で比較的珪藻の多かったグループ 1 では、*Thalassiosira*、*Actinocyclus*、*Bacillaria*、*Chaetoceros* 属で構成された。グループ 2 も、珪藻の割合はやや高く、*Rhizosolenia*、*Eucampia* など構成された。珪藻の割合が低かったグループ 3 では、*Thalassiosira*、*Skeletonema*、*Leptocylindrus* などが優占種であった。

エ) 繊毛虫の組成 (図 11)

今回の解析で、主要生物として、繊毛虫が検出された。グループ 1 は、繊毛虫の割合は比較的低かったが、*Strombidium*、*Pelagostrombidium* などが認められた。グループ 2 は、繊毛虫の割合が高く、*Strombidium* が主要であった。グループ 3 は、繊毛虫の割合は季節によって異なったが、比較的高く、*Tiarina*、*Tintinnopsis* などで構成された。

以上、2021 年の 3 月から 11 月までの通常期から赤潮発生期間について、道東から道南沿岸域にかけて得られた海水試料中の環境ゲノムに基づき、18S rDNA 領域の生物組成を比較した結果、渦鞭毛藻類が全体の 50%以上を占め、珪藻類、繊毛虫類の割合が高という結果が得られた。生物組成は大きく 3 グループに類型化され、海域や赤潮/非赤潮期間との関係性も認められた。赤潮期間中である 10 月の試料を含むグループ 3 では、*K. selliformis* の優占が認められるなど、現場環境と一致する結果が得られた。また、*K. mikimotoi* など有害藻類による赤潮期間後半で、しばしば *Strombidium* などの繊毛虫が観察されることがあるが、本結果においても、珪藻類の他に繊毛虫も多く認められ、赤潮期間後半に繊毛虫が増加し、他の渦鞭毛藻や珪藻に置き換わるような生物組成の変化が推察された。ただし、18S rDNA の解像度は高いとは言えず、種レベルの解析はできなかったため、今後 28S rDNA においても解析し、本結果と統合し総合的に生物組成の変化を把握する必要があると考えている。

4) 培養株の維持培養方法と大量培養系の確立

分離した培養 13 株中は 10 株について、一年半の間継代培養し、現在も維持している。継代培養の条件においては、増殖速度は 0.65 divisions d⁻¹、最高細胞密度は 23,650 cells mL⁻¹であった (図 12)。300 mL 容三角フラスコにおいては、増殖速度は 0.51 divisions d⁻¹、最

高細胞密度は $14,933 \text{ cells mL}^{-1}$ で、継代培養よりも増殖が低下した。2 L ガラス瓶で培養した場合、培地量が 0.5 L、1 L、2 L における最高細胞密度はそれぞれ $5,700 \text{ cells mL}^{-1}$ 、 $4,700 \text{ cells mL}^{-1}$ 、 $2,100 \text{ cells mL}^{-1}$ で培地量が多くなるほど増殖が低下した。アクリル容器ではほとんど増殖せずに 1 週間後には死滅した。その他、ポリスチレン製の透明フラスコ (Thermo Fisher Scientific 製、Nunc 製細胞培養用処理済み EasYFlask、25 および 75 mL 容) については経時的な細胞密度は追跡しなかったが、十分増殖することを確認した。以上の結果から、*K. selliformis* の培養可能スケールは最大で 1 L 程度で、スケールが大きいほど増殖速度や最高細胞密度が低下することが分かった。

5) 増殖生理特性の解明

① 水温・塩分・光強度が増殖速度に及ぼす影響の把握

Karenia selliformis の最大増殖速度は、Ks-1 株では 17.5°C 、塩分 25、Ks-6 株では 20°C 、塩分 20、Ks-13 株では 17.5°C 、塩分 30 で得られ、それぞれ $0.62, 0.76, 0.51 \text{ div. day}^{-1}$ であった。最大細胞密度は Ks-1、Ks-13 株では 17.5°C 、塩分 30、Ks-6 株では 17.5°C 、塩分 25 で得られ、それぞれ $20,400, 16,800, 12,600 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。水温の増殖可能範囲は全ての株において $10\sim 22.5^\circ\text{C}$ であり、 5°C では緩やかに死滅し、 25°C では馴致培養の時点で速やかに死滅した。塩分についてはすべての株で、塩分 $15\sim 33$ で増殖が確認されたが、塩分 15 では増殖速度が顕著に低下した。また、*K. selliformis* を異なる光条件で培養した結果、増殖速度は Ks-1、Ks-6 株で $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、Ks-13 株で $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で最大となり、それぞれ $0.77, 0.71, 0.63 \text{ div. day}^{-1}$ を示した。増殖に必要な最小光強度 I_0 は Ks-1、Ks-6、Ks-13 株でそれぞれ $19.7, 16.2, 30.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、半飽和定数はそれぞれ $94.1, 89.0, 64.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。すべての株において、強光 $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ では増殖速度がわずかに低下し、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下の弱光では増殖しなかった。

以上の結果から、*K. selliformis* は $15\sim 22.5^\circ\text{C}$ 、塩分 $20\sim 33$ 、光強度 $100\sim 1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で活発に増殖することが示唆され、至適条件に大きな株間差はないことが明らかとなった。また、 25°C 以上、 5°C 以下では増殖不可能であり、この結果は北海道東部太平洋での赤潮発生時の環境と概ね一致した。また、本成果から当該海域における越冬の可能性は低いと考えられるが、低温下における増殖と光強度の関係は未解析であるため、今後の更なる検討が必要である。

② 細胞の大きさや色素量の変化に与える環境要因の検討

Karenia selliformis は GA 水溶液の添加作業後、イメージサイトメーター計測時間の 2 分間以内において、細胞形態への明確な変化は認められなかった。*Karenia selliformis* の細胞密度は培養初期の $1.1 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ から徐々に増加し、培養 9 日目に最高細胞密度 $6.2 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ になった後、漸減した。この間、細胞サイズ (直径) は $24\sim 25 \mu\text{m}$ 程度で推移していたが、培養末期の 41 日目には $29.5 \mu\text{m}$ に増加した。また、細胞のクロロフ

イル自家蛍光強度は培養開始から 16 日目までは概ね一定であったが、培養 20 日目を以降減少する傾向にあった。これらの結果から、培養の定常期から末期にかけて細胞サイズが大きくなる傾向があること、細胞の自家蛍光は定常期の後期に徐々に減少する傾向があることが確認できた。一方で、天然の細胞で観察された葉緑体が消失した細胞は、培養の間、確認できなかった。

6) 生活史の把握

海底泥中における *K. selliformis* のシストの存在を調べるために、北海道道東から道南にかけて採集した赤潮発生期や非発生期の海底泥を用いて栄養細胞発芽試験を行った結果、水温 15°C、光強度 50 および 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件において、観察したすべての試料から *K. selliformis* の栄養細胞の発芽は確認できなかった。

次に、 GeO_2 を添加しないで、珪藻類の発芽試験を行い、発芽した量および種について評価した。その結果、珪藻の発芽量は、2021 年 11 月初旬の根室港、花咲港、浜中港、大津港、大樹港で多かった。珪藻の種類については、赤潮発生期であった 2021 年 10 月 12 日の海底泥は、*Chaetoceros* spp. が主要であり、11 月初旬は、*Skeletonema* spp. が道東から道南まで広く検出され、*Thalassiosira* spp. は道東で多かった。2022 年の冬季試料については、全体的に珪藻量が少なく、*Nitzschia* spp. が主要であった (図 13)。渦鞭毛藻類については、発芽した栄養細胞は非常に少なかったが、*Scrippsiella* spp. がより頻繁に検出された。

以上より、北海道道東から道南沿岸における珪藻類のシストは、赤潮発生期や冬季では少なく、赤潮衰退後の道東に多いという結果が得られた。

シストあるいは一時シストの形成の可能性を検討するため、比較的低温下で培養した細胞を不定期に観察した。増殖の定常期に入ったウェルでしばしば球形の不動の細胞が観察されたが、その多くは葉緑体を持ち、クロロフィル蛍光が観察された。一方、不動細胞の中に被膜につつまれクロロフィル蛍光がわずか、あるいは観察されない細胞がまれに観察されることがあった (図 14)。細胞の外形には横溝の形跡が観察され、細胞内には red body と思われる構造が観察された。本細胞の発芽、復活は確認することができなかった。観察された細胞が *K. selliformis* のシストあるいは一時シストの可能性も考えられるが、その出現はまれであったことから、赤潮への寄与は低いと推察される。今後は、遺伝子等を用いた冬季の海水および底泥中の *K. selliformis* の探索により越冬形態を把握することが重要と考える。

【成果の概要】

本課題では 2021 (令和 3) 年に北海道太平洋沿岸で発生した赤潮原因プランクトンの生物学的特性について検討し、下記の成果が得られた。

1) 赤潮の優占種が渦鞭毛藻 *Karenia selliformis* であったこと、その rDNA 配列 (ITS および LSU 領域) は 2020 年にロシア・カムチャツカに発生した赤潮試料の *K. selliformis* の

ものと一致することを明らかにした。副次的研究成果物として、観察したカレニア科渦鞭毛藻の写真を整理して種同定の参考となる資料を作成、モニタリングにおいて細胞形態による種同定をより正確に実施するための基盤を構築した。

2) *K. selliformis* の形態観察に適した化学固定法を確立し、DAPI による核染色を併用して本種と形態が酷似している *Karenia mikimotoi* や *Karenia longicanalis* との種判別手法を確立した。また、遺伝子検出手法の一つである LAMP 法を用いた *K. selliformis* の高感度検出手法を確立した。

3) 環境 DNA メタバーコーディング解析により赤潮発生前から発生期間の道東から道南までのプランクトン種組成の変化を、18Sr DNA に基づいて整理した。得られたデータより、生物組成は3つのグループに類型化され、地理的な影響を受けていることが推察された。

4) 2021年に発生した赤潮海水から複数の *K. selliformis* 培養株を確立した。得られた培養株は本種の増殖生理特性や有用海産生物への影響評価に寄与した。また、本種の大量培養に適した条件を明らかにし、その成果は本事業課題(1)アの研究遂行に寄与した。

5) *K. selliformis* の増殖至適環境を培養株を用いて検討し、水温(15~22.5°C)、塩分(20~33)、光強度(100~1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)であること、25°C以上および5°C以下では増殖不可能であることを明らかにした。また、*K. selliformis* 細胞の形態および葉緑体自家蛍光の変化を調べ、培養の定常期から末期にかけて細胞サイズが大きくなる傾向があること、細胞の自家蛍光は定常期の後期に徐々に減少する傾向があることを確認した。

6) シストの存在の有無を調べるため、MPN法による底泥中からの発芽や、*K. selliformis* 培養株の観察を行ったがシストは確認できなかった。本種の越冬形態には不明な点が多く、さらなる検討が必要である。

【謝辞】

メタバーコーディング解析については水産研究・教育機構の長井敏氏のご協力をいただきました。また、北海道大学の伊佐田智規准教授には2021年9月に厚岸湾で採集した赤潮海水の提供を受けました。ここに記して感謝申し上げます。

【引用文献】

Imai I, Itoh K, Anraku M. Extinction dilution method for enumeration of dormant cells of red tide organizations in marine sediments. Bull Plankton Soc. Japan, 1984; **31**: 123–124.

Iwataki M, Lum WM, Kuwata K, Takahashi K, Arima D, Kuribayashi T, Kosaka Y, Hasegawa N, Watanabe T, Shikata T, Isada T, Orlova TY, Sakamoto S. Morphological variation and phylogeny of *Karenia selliformis* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in an intensive cold-water algal bloom in eastern Hokkaido, Japan. Harmful algae, 2022; **114**: 102204.

Katano T, Yoshida M, Lee J, Han M-S and Hayami Y. Fixation of *Chattonella antiqua* and *C.*

marina (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. *Phycologia*, 2009; **48**: 473–479. DOI: 10.2216/08-102.1.

Orlova TY, Aleksanin AI, Lepskaya EV, Efimova KV, Selina MS, Morozova TV, Stonik IV, Kachur VA, Karpenko AA, Vinnikov KA, Adrianov AV, Iwataki M. A massive bloom of *Karenia* species (Dinophyceae) off the Kamchatka coast, Russia, in the fall of 2020. *Harmful Algae*, 2022; **120**: 102337.

紫加田知幸、櫻田清成、城本祐助、小山長久、生地 暢、吉田 誠、大和田紘一. 八代海におけるラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖および栄養塩の関係. *日本水産学会誌*. 2011 ; **77** (1) : 40-52.

表 1 メタバーコーディング解析に用いた試料. ●は、実験①で解析領域の検討に用いた試料.

No.	サンプル名	採取年月日	採集地	リード数	OTU数
1	Erimo_S315_L001	2021/11/2	襟裳岬	7696	133
2	hamanaka_S308_L001	2021/11/1	浜中(霧多布)	7976	284
3	Hanasaki_S307_L001	2021/11/1	花咲港	8559	259
●4	Ka.E.18S_S343_L001	2021/10/11	桂恋 東	4982	149
●5	Ka.We.11.18S_S342_L001	2021/10/11	桂恋 西	7597	149
6	Katsu_S310_L001	2021/11/1	桂恋漁港	6356	320
7	Nemuro_S306_L001	2021/11/1	根室	6084	356
8	Ni.18S_S344_L001	2021/10/12	西港	7771	227
9	Osh.18S_S345_L001	2021/10/12	老者舞	7617	156
10	Oshira_S313_L001	2021/11/2	音調津	6480	142
11	Otsu_S311_L001	2021/11/2	大津港	5343	211
12	Rosha_S309_L001	2021/11/1	老者舞	4701	219
13	Rushi_S314_L001	2021/11/2	ルシベツ	6418	376
14	Taiki_S312_L001	2021/11/2	大樹	5840	217
15	X21.326P_S316_L001	2021/3/11	北水研取水	7217	239
16	X21.346P_S317_L001	2021/7/29	北水研取水	6807	373
17	X21.347P_S318_L001	2021/8/5	北水研取水	5728	450
18	X21.352P_S319_L001	2021/9/10	北水研取水	5451	369
19	X21.353P_S320_L001	2021/9/16	北水研取水	5779	254
20	X21.359P_S321_L001	2021/9/28	北水研取水	7291	269