

図3. 有明海における水温および塩分の変動

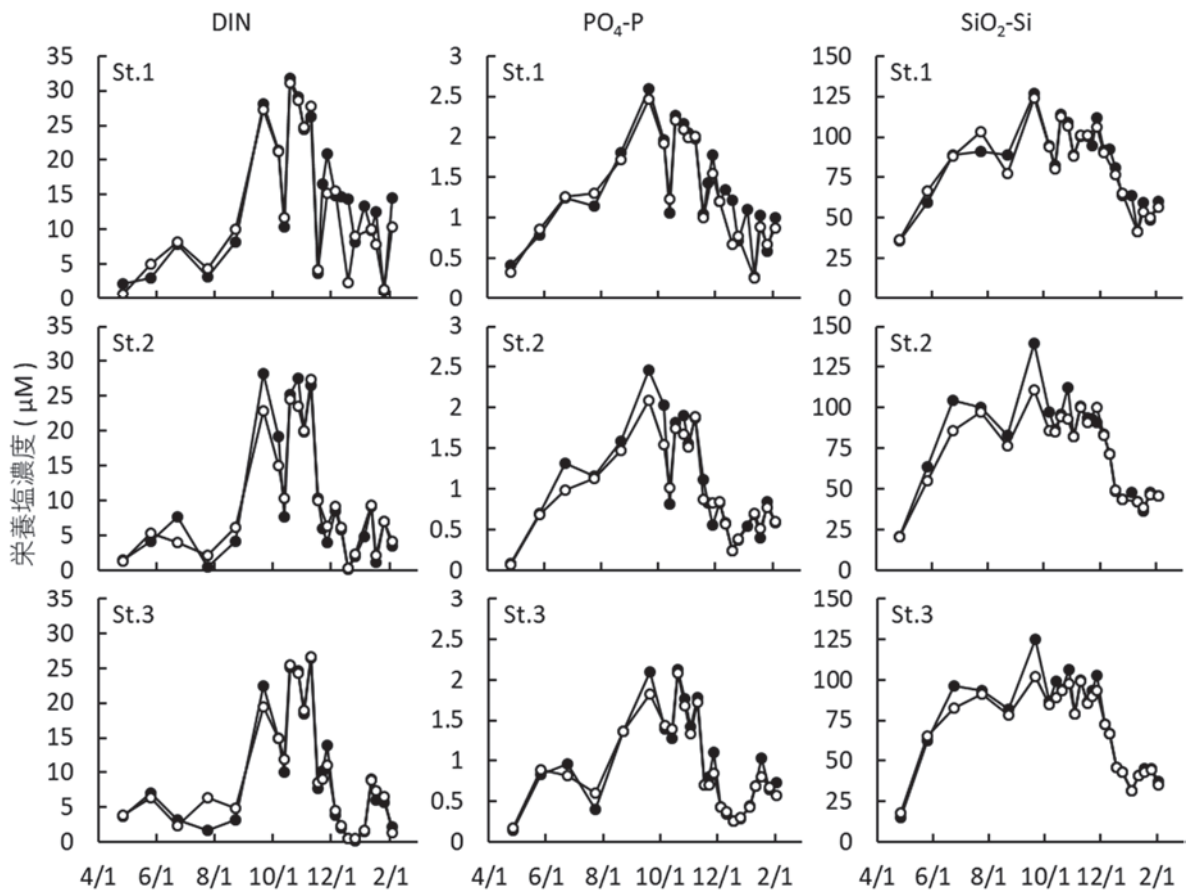


図4. 有明海における栄養塩濃度の変動 (●表層, ○底層)

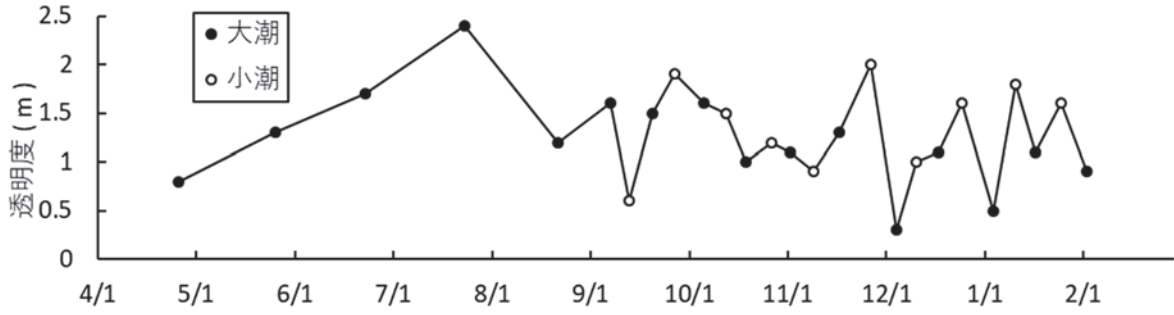


図 5. St. 3 における透明度の変動

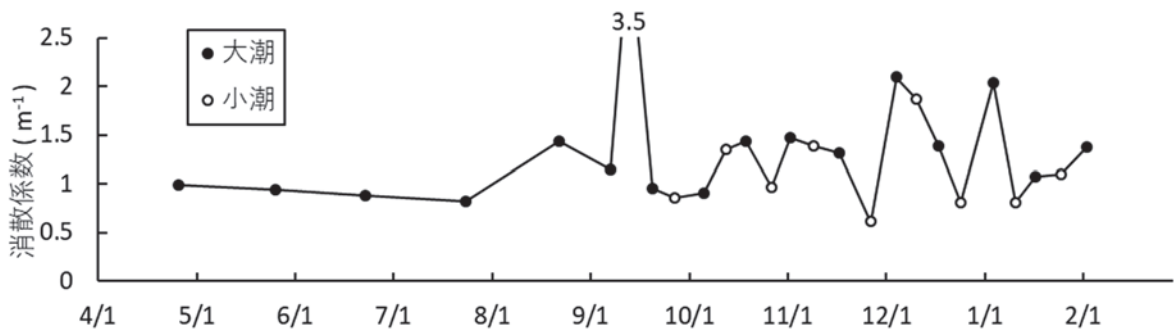


図 6. St. 3 における消散係数の変動

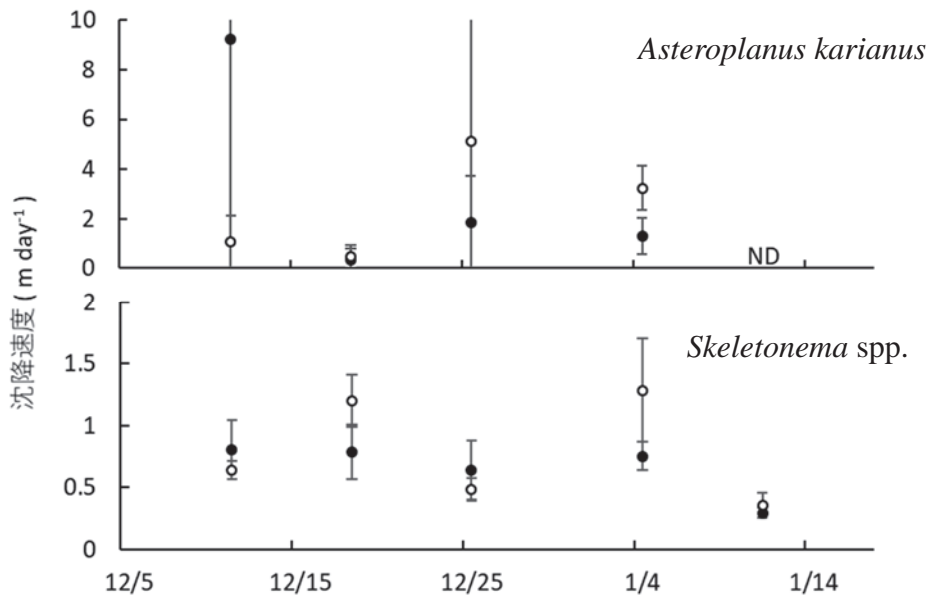


図 7. St. 3 における *A. karianus* および *Skeletonema* spp. 野生個体群の沈降速度の短期変動 (●表層, ○底層)

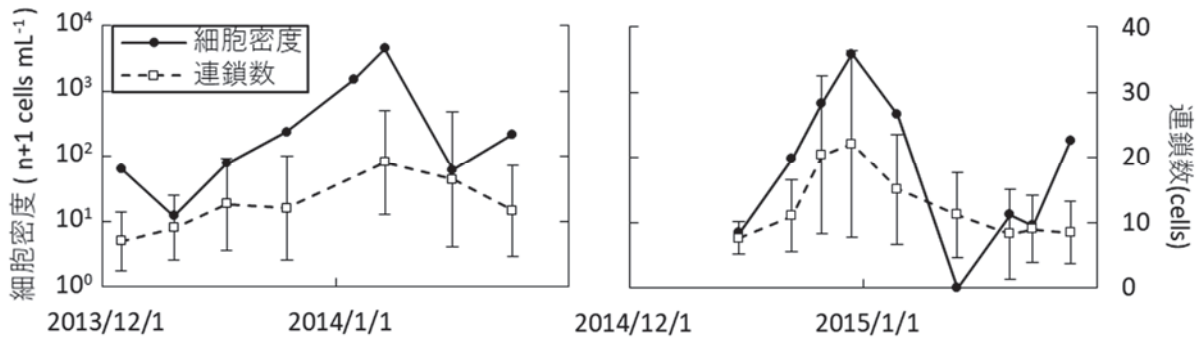


図 8. *A. karianus* 現場個体群の細胞密度および連鎖数の変動  
(2013 および 2014 年度)

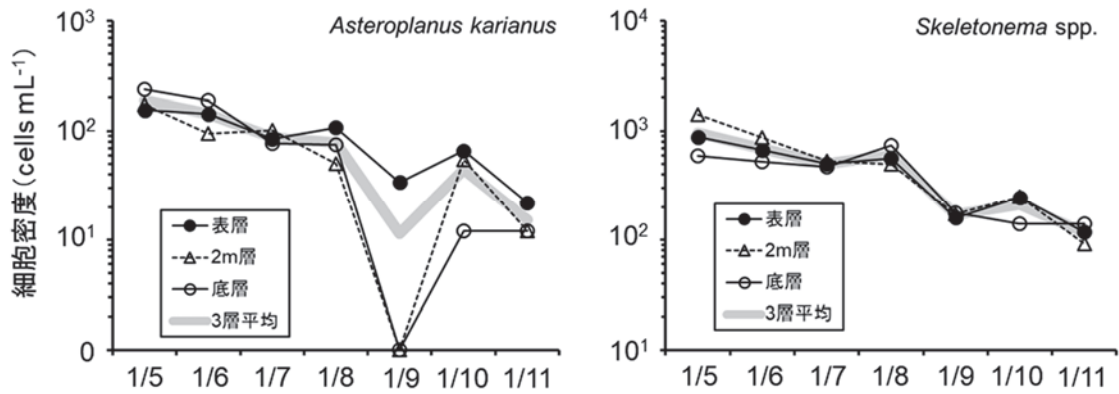


図 9. ミクロズム試験海域における *A. karianus* および *Skeletonema* spp. の現場動態

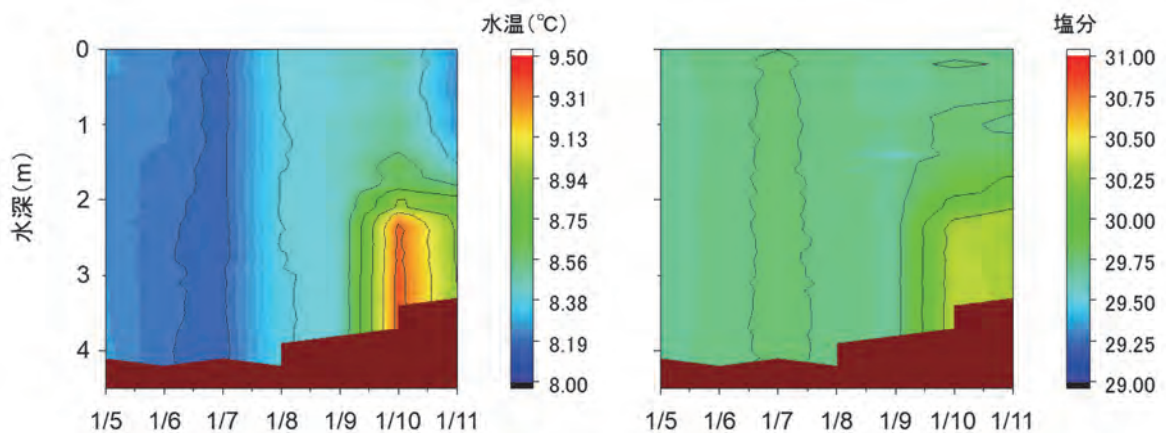


図 10. ミクロズム試験海域における水温および塩分の鉛直プロファイルの変化

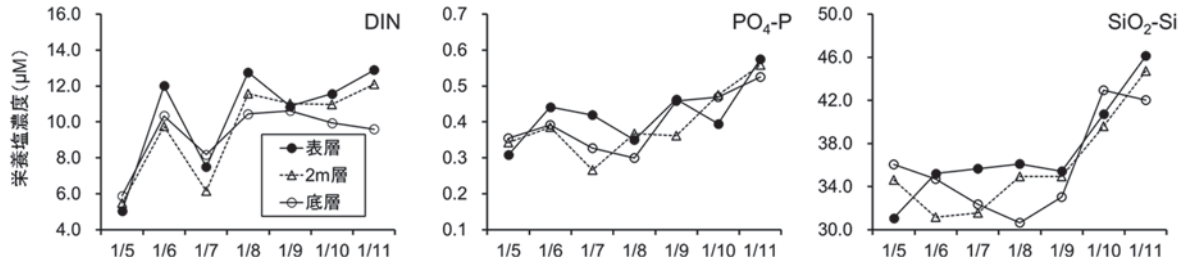


図 11. ミクロコズム試験海域における DIN, PO<sub>4</sub>-P, SiO<sub>2</sub>-Si の変動

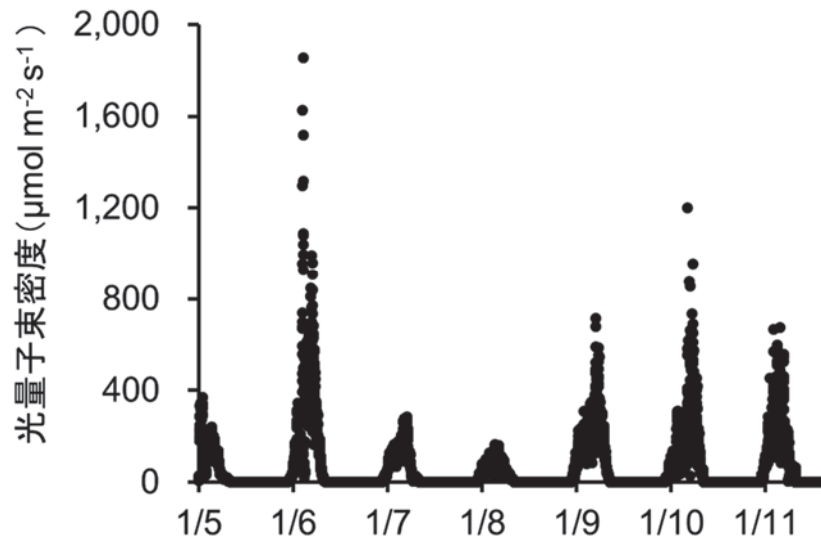


図 12. ミクロコズム設置水深 (0.1 m) における光量子束密度の変動

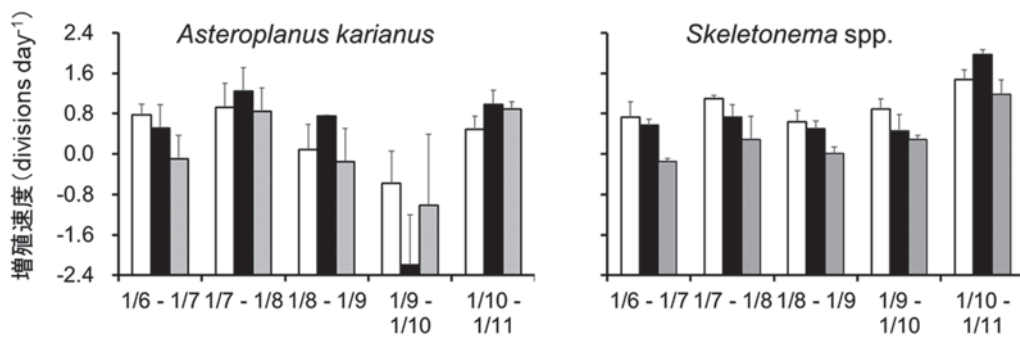


図 13. *A. karianus* および *Skeletonema* spp. のボトル内における増殖速度 (□生海水, ■NP 添加, ▒NP 添加+遮光)

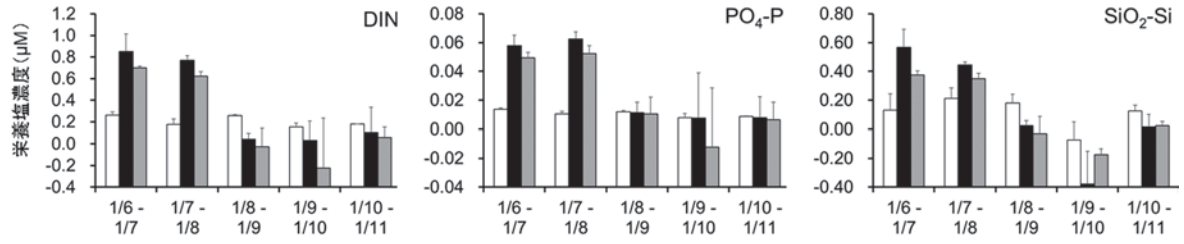


図 14. ボトル内における単位クロロフィル *a* 量当たりの栄養塩濃度の減少量  
(□生海水, ■NP 添加, ■NP 添加+遮光)

### 3) ノリ色落ち珪藻の発生モニタリング，発生機構解明，予察技術開発

#### ②ノリ色落ち原因珪藻の生物学的諸特性の解明

#### イ. ノリ色落ち原因珪藻類による栄養塩摂取特性の把握と現場栄養塩環境の予測技術開発

高知大学

山口晴生

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

外丸裕司

## 1 全体計画

### (1) 目的

近年，日本沿岸域では，いくつかの珪藻類が赤潮を形成し，しばしばノリの色落ちを引き起こしている。それに伴う漁業被害を未然に防止あるいは軽減するためには，ノリの色落ち原因珪藻類の発生とそれに伴う栄養塩の変動を事前に予測することが重要である。そこで本課題では，ノリの色落ち原因珪藻類ならびにその競合種である鞭毛藻類の発生を決定付ける栄養塩摂取諸特性ならびに栄養塩の変動に関わる諸要因を明らかにし，それらの結果に基づき，当該藻類が出現した際の現場栄養塩環境を予測するための新規技術開発を行う。

### (2) 試験等の方法

これまでに確立した，ノリの色落ち原因珪藻類ならびにその競合種培養株の栄養塩（とくに窒素・リン）摂取に関わる培養試験を担当機関が共同して実施する。また，現場海域における栄養塩の変動ならびに各種藻類による栄養塩の摂取を推定可能な技術基盤の構築を実現する（高知大学主導）。具体的には，1）栄養塩の新規検出手法の開発，2）供試藻の栄養塩摂取に関わる遺伝子の分布・発現の解析（瀬戸水研と共同），3）栄養塩環境の予測モデル構築を実施する。以上により得られた結果を，統計学的手法により精査・解析し報告する。

## 2 平成 29 年度計画及び結果

### (1) 目的

全体計画と同じ

### (2) 試験等の方法

全体計画と同じ

#### 1) 珪藻 *Asteroplanus karianus* の栄養塩利用に関わる遺伝子群の性状

冬季の有明海にて頻発するようになった珪藻 *A. karianus* に着目し，有明海産の当該藻無菌クローン株より RNA を抽出した。昨年度，次世代シーケンサー解析によって得られた多数の mRNA 配列群の性状解析を行うことで，硝酸塩輸送体 2 (NRT2) およびリン酸塩輸送体 (PiT) に該当するものを決定しようとした。

#### 2) 正リン酸塩を迅速に蛍光定量可能な系の確立

本研究では，海水中の正リン酸濃度の増減に伴うローダミン B 蛍光の変動（本水ほか 2000）をプレートリーダーによって高速定量することで，従来法よりも微量かつ多数の海水試料を対象に，迅速に正リン酸を蛍光定量可能な系を構築しようとした。この定量系に対する海水の適用可能性を検討するため，海水に含まれるケイ酸塩・塩分が蛍光定量に及

ぼす影響について調べた（方法の詳細は昨年度の報告書を参照）。

### 3) 珪藻 *Asteroplanus karianus* の赤潮発生・拡大に伴う栄養塩予測手法の開発

先行的に得られた、*A. karianus* 現場個体群の増殖速度（Yamaguchi et al. 2014）、ならびに培養試験で得られた栄養塩摂取速度等の数値（Yamaguchi et al. 2014）を用いることで、本種赤潮に伴う栄養塩消費の簡易モデル式を構築しようとした。このモデルにおける *A. karianus* の増殖は、昨年度新たに見出された推定溶藻因子の影響などにより、細胞密度  $1.0 \times 10^4$  cells/mL で飽和（停止）することとしている。モデル式で得られた栄養塩の推定値と実測値との関係について調べるため、2008年度、2009年度および2011年度の冬季における溶存硝酸塩・リン酸塩の濃度を採用した。これらのうち2009・2011年度においては *A. karianus* が主体となるブルームが観察されているため、本種の増殖に伴う栄養塩変動を解析する上では適当と判断された。

#### (3) 結果及び考察

##### 1) 珪藻 *Asteroplanus karianus* の栄養塩利用に関わる遺伝子群の諸性状

NRT 二種あるいは PiT の推定アミノ酸配列を決定し（図1）、輸送体に特徴的な膜貫通領域を見出すことができた（図2）。一方で、シグナルペプチドは認められず、また細胞質・葉緑体に対する局在性も有意には認められなかった（データ示さず）。これらを総合すると、選抜した遺伝子群三種は、その配列性状から輸送体として特徴付けられる。

各種微細藻に分布することが知られる NRT2 および PiT は、*Chaetoceros tenuissimus* などのいくつかの珪藻種においてはそれぞれ窒素およびリン酸塩欠乏下で誘導発現されることが報告されている（Shih et al. 2015）。今回、それらに該当すると考えられる配列を有明海産 *A. karianus* より得ることができた。これより、窒素・リンの利用あるいは充足・不足状態を推定可能なマーカー候補を選抜できたと判断した。すでにハウスキーピング遺伝子のアクチンならびに TATA 結合タンパク質の配列が得られており、*A. karianus* の栄養塩利用の解明に関わる貴重な知見を整備することができた。ただし残念ながら、NRT・PiT の発現を定量するには至らず、生理状態との関連性が解析できていないため、今後検討を有する。

##### 2) 正リン酸塩を迅速に蛍光定量可能な系の確立

海水中のケイ酸塩によって正リン酸塩に由来する蛍光量は大きく変動しないことが明らかとなり（図3）、海水試料でも正リン酸塩を定量可能な系を確立できたと判断された。一方で、塩分の影響は無視できず、試験区が少ないものの、塩分の増大に伴う蛍光値の減少が認められた（データ示さず）。

多数の流入河川を有する有明海では、一般的に塩分が25から30程度の範囲で変動し、ときに10程度にまで低下することが報告されている（Aoki et al. 2015）。このような海域における正リン酸塩の濃度を蛍光法で測定するためには、あらかじめ各塩分における検量線を作製し、塩分の変動に応じて蛍光値を補正する必要がある。今回、試験した塩分条件が少ないため、特に塩分20~30における補正の法則を見出すことができなかった。今後、塩分の補正関数を算定し、開発した系を実用的な仕様にしていく必要がある。

##### 3) 珪藻 *Asteroplanus karianus* の赤潮発生・拡大に伴う栄養塩予測手法の開発

これまでに得られた *A. karianus* の生理学的パラメーターを用いた簡易なモデル式によって、本種の冬季ブルーム発生・拡大に伴って硝酸塩濃度が低下する時期をおおむね予測することができた（図4）。今回試験対象にした2008年度においては、*A. karianus* の細胞密

度が低く、また多くの *Skeletonema* 細胞との共存繁茂が認められたことから、予測は困難と判断された（データ示さず）。一方、*A. karianus* の優占繁茂が認められた 2009 年度は、シミュレーションによって、硝酸塩濃度が水産用水基準を下回る時期を推測することができ、その時期は実際の枯渇時期と重なっていた（図 4）。2011 年度の結果はより顕著であり、おおよその栄養塩環境を予測することが可能ではないかと示唆される。

しかし一方で、リン酸塩濃度の予測精度については改善を要すると言わざるを得ない。今回のシミュレーションでは、リン酸塩濃度の減少がかなり大きく、実際よりも早期に枯渇することが示された（図 4）。この原因の一つとして、リン酸塩の摂取速度が過大に評価されていることを挙げる。多くの微細藻類は、環境水中のリン酸塩を必要以上に獲得する“贅沢摂取 (Luxury uptake)”を行うことが知られている (Rhee 1973, Cembella et al. 1984, 樽谷 1999)。実際、*A. karianus* の硝酸塩摂取速度に対するリン酸塩のその比は 0.8 と同程度であり、レッドフィールド比 16 と比べると極端に小さい (Yamaguchi et al. 2014)。おそらく当該藻のリン酸塩摂取速度は過剰評価されており、そのことが計算モデルにおけるリン酸塩の急減につながったのではないかと示唆される。そこで、窒素 16 に対するリンの摂取比を 1 として再計算したところ、リン酸塩の枯渇を高精度に再現できる場合もあれば、再現性が極めて低くなることもわかった。これらを踏まえると、冬季の有明海における *A. karianus* の増殖は窒素で制限されやすく、結果としてリンの消費が抑えられていると考えられる。このことがリン酸の濃度予測を困難にしている要因の一つかもしれない。今後、*A. karianus* のブルーム期における栄養塩の変動を予測するためには、海水中の栄養塩データをもとに、沿岸海域で起こり得る窒素およびリンの摂取比を算出する必要がある。また、栄養塩枯渇を確率的に予想することで、ノリの早期収穫あるいはダムの放水などの色落ち対策を、従来よりも合理的に、かつ効率よく行うことができよう。

今回の予測手法の特徴は、Excel (Microsoft®) を計算ソフトに用いている点にある。数理学の専門分野においては、栄養塩変動の予測シミュレーションにはコンパイラソフトが一般的に用いられる。しかしながら、このソフトの操作は煩雑になりやすいことから、専門分野外の漁業者には馴染みがないと言えよう。現在普及している PC のほとんどには表計算ソフトの Excel がプレインストールされており、一般に普及していると判断される。それゆえに、社会で広く本ソフトが活用されている。冬季、*A. karianus* の発生が認められた段階で、本種の細胞密度および硝酸塩濃度を Excel に入力すれば、予測値を算出することができる。データを新たに取得して入力すれば、より予測値の精度は向上すると期待される。このような操作は一般的な PC 使用者でも可能であり、有明海を生活の場とするノリ養殖業者はもちろんのこと、行政者・ダム管理者など様々なステークホルダーの使用ニーズに応えることができる点で、今回確立した技術基盤は波及性が高い。

### 3 5 年のまとめ

近年、わが国の代表的なノリ生産地である有明海では、冬季になると羽状目珪藻 *A. karianus* の赤潮が発生し、それに伴うようにノリの色落ち現象が報告されている。これまでに、有明海における *A. karianus* の動態が報告されているものの (松原ほか 2014)、その動態と関連した栄養塩の変動については十分明らかにされていなかった。本課題の担当者らは、5 年にわたる研究活動によって以下の成果を蓄積し、新奇赤潮の拡大に伴う栄養塩変動の予測技術



基盤を構築することができた。

## 1. 新奇赤潮珪藻 *A. karianus* と栄養塩の消長

### 1-1. 系統学的位置と栄養塩摂取特性

有明海北部のノリ養殖場にて発生する *A. karianus* 個体群は、rDNA レベルでは均一の集団であることが判明した。さらに培養試験によって、*A. karianus* ブルームの窒素・リン摂取能は、従来のノリ色落ち原因珪藻のそれと同様に、極めて大きいことが明らかとなった。その一方で本藻は、有機形態のリン化合物をほとんど利用できないようである。

### 1-2. 冬季有明海におけるブルームと栄養塩の変動との関連

冬季の有明海における *A. karianus* は約 0.68 divisions/day のスピードで増殖し、それに伴い海水中の栄養塩（特に窒素）をすみやかに消費することがわかった。先の生理学的知見と総合することで、本種赤潮が数日間発生した場合、海水中の窒素が速やかに枯渇することを実証できた。

### 1-3. 溶藻因子の発見

*A. karianus* の溶藻因子を新たに見出すことができた。本種のブルーム期間中に珪藻ウイルスに位置づけられる RNA 配列が得られ、さらに分離株の溶藻現象も確認された。これらより、*A. karianus* のブルーム衰退もしくはそれに伴う栄養塩の再生に関わり得る、おそらくウイルス様の溶藻因子が存在することを初めて示唆した。

### 1-4. 栄養塩摂取に関わる遺伝子群の解析

RNASeq により *A. karianus* の発現遺伝子群を網羅的に解析することで、栄養塩摂取に関わる輸送体遺伝子などの遺伝子配列を多数得ることができた。また、遺伝子発現の定量に欠かせない内部標準候補も得ることができ、*A. karianus* の栄養塩摂取を分子レベルで解明可能な基盤知見を整備することができた。

## 2. 栄養塩摂取に関わるモニタリング手法の開発

珪藻各種の有機態リン利用能を決定付ける各種分解酵素群の網羅解析基盤を開発した。さらに、多くの海水微量検体に含まれるリン酸塩濃度を簡易・迅速に定量可能なシステムを構築することができた。これらの系は、プレートリーダーと呼ばれる分光・蛍光測定機器の導入によって実現し、具体的には、30 秒に満たない時間で 100 近い検体の吸光・蛍光測定を測定することができる。今後、インジェクターとの組み合わせ等により、現在よりも効率的に栄養塩摂取に関わるモニタリングが可能になると期待される。

## 3. 栄養塩変動の予測モデル基盤の構築

先に得られた *A. karianus* の増殖速度と栄養塩摂取速度を用いたモデル式によって、*A. karianus* の増殖にともなう硝酸塩濃度の減少をかなり近似に再現することができた。ここでは、数値解析の熟練度に関係なく、簡単な操作で栄養塩変動を予測できるよう Excel (Microsoft®) を活用した。すなわち、*A. karianus* の細胞密度ならびに栄養塩の実測値を入力すれば、水産用水基準を下回る栄養塩枯渇時期をおよそ推定可能である。

## 4. 珪藻とノリとの共培養系の構築

一般的には珪藻等の微細藻類の培養に用いられている SWM-3 培地においても瀬戸内海産・有明海産ノリ (*Pyropia yezoensis*) を培養でき、周年にわたって培養株を維持することができた。このことは、一つの系内にてノリと珪藻を共培養できることを意味しており、今後、前者の無菌化に成功すれば、珪藻の繁茂とノリの色落ちをより深く理解するための基盤技術

が構築できるものと期待される。

#### 総括

これまで冬季の有明海にて *A. karianus* が発生した場合、今後の栄養塩の減少を科学的な根拠に基づいて予測することはできなかった。今回構築した予測技術をより現実に即したものと改善し、それを活用することで、科学的知見に基づく栄養塩の変動予測が果たせよう。これにより、ノリ養殖場を生活の場とする漁民あるいは市民に対して栄養塩の変動をわかりやすく伝え、色落ち被害を軽減するための対策（栄養塩の供給策など）を合理的に展開することにつなげることができると期待される。このような観点から、5 ヶ年にわたる本課題の遂行・達成は、水産環境の保全の観点から極めて意義深いものであり、水産業の持続的な発展に資するものである。

この事業課題の遂行にあたって、貴重な栄養塩データをご提供いただいた佐賀県有明水産振興センターの太田洋志様ならびに三根崇幸博士、現瀬戸内海区水産研究所の松原賢博士に厚く御礼申し上げます。

#### 4 引用文献

- Aoki K, Onitsuka G, Shimizu M, Yamatogi T, Ishida N, Kitahara S, Hirano K. *Chattonella* (Raphidophyceae) bloom spatio-temporal variations in Tachibana Bay and the southern area of Ariake Sea, Japan: Interregional displacement patterns with *Skeletonema* (Bacillariophyceae). *Mar. Poll. Bull.*, 99, 54–60. 2015.
- Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 10, 317–391, 1984.
- 松原賢, 横尾一成, 川村嘉応. 有害珪藻 *Asteroplanus karianus* の有明海佐賀県海域における出現動態と各種環境要因との関係. *日水誌*, 80, 222–232, 2014.
- 本水昌二, 大島光子, 勝村直也. 海水中のリンの蛍光検出フローインジェクション法. *J. Flow Injection Anal.*, 16, 101, 2000.
- Rhee GY. A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.*, 9, 495–506, 1973.
- Shih C-Y, Kang L-K, Chang J. Transcriptional responses to phosphorus stress in the marine diatom, *Chaetoceros affinis*, reveal characteristic genes and expression patterns in phosphorus uptake and intracellular recycling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 470, 43–54, 2015.
- 樽谷賢治. 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖機構に関する生理生態学的研究. *瀬戸内研報*, 1, 63–96, 1999.
- Yamaguchi H, Minamida M, Matsubara T, Okamura K. Novel blooms of the diatom *Asteroplanus karianus* deplete nutrients from Ariake Sea coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 517, 51–60, 2014.

NRT2 1 YWTSRMFTKEVWGTANATVGGWGNLGGGVTVQILMGSILFPLFTTIYNGNTEKSWRTVCIF  
 61 PAMIGIVTSYCVIKYSDDSPNGNYSKLLKKQDQMGHVSIVDSFRKGTFTNTWLL

NRT 1 LASQNSKFDSYNVKVDRSQLDKATEIALCRMHRPHMRAFHASWFSFFIAFFTWF SITPLL  
 61 TEVKDTLDLSKEEIWTSNLCATAGTIIMRILIGPFCDFGARICMAFILVVS AIPAGMTG  
 121 LVNTSAGLSTLRSFVGIAGASFVACQYWTSSMFTKEIAGTANALVAGWGNLGGGATQLVM  
 181 GTILFPLFKVIYNQNDEEENEVGENNMSSEEKAWRTVFVVPALLSLITAFVIVAYCDDCP  
 233 KGDYRQVRVQQEIEVVSPGASLAASFANRNWILALQYACCFGVEVTMTNASALYFEEEF  
 293 GQTTEAAAAIAAIFGLMNLFARGFGGYWSDYFNLRHGMKGRLLWQFLTL SVQGGCVMLFA  
 353 FADSLPAAIFALILT SLLVQSAEGSTFGIVPYVDRRYTGAVVGFV GAGGNVGGVVF AAMF  
 413 RQFSYEKAFAY

PiT 1 KITMSKSLLSLSLEQQTTRVVNNRSEAL IENNGNDSKNQKLTVRQWFNECAWPGMGLFGE  
 61 SYLLFSVGI LKPVWEMLYPECFAETCSPKLLHSLTYNVVLGVICGMILLGTLANTIGRR  
 121 AGSITTASLMAFGALGMTLSSMVFASNAELLFQSMSVLLFVFGVGVGG EYPLSASSASER  
 181 AMTLLEERQKAEKEEKRMEGTEQRNLTQSKGGELSRGKRVLV FAMQGMGIFVNTLALT  
 233 SLLFFAGQFGAKGDAQDGEYDDDIFIDGLYDSSTLLGIWRITYAIGAA ILAYVLVSRIQY  
 293 LTESQVWAEDKQRREEIQQVPSVSVSPKTPPVI STTLSDEISALSNNSAFAPSIVPSIAT  
 353 YTGQEDLQSSSIELLFRYGGWRLMGT SSTWLLWDIAFYGNKLFQSSFILALTGENTLLE  
 413 LCAASALN

図1 *Asteroplanus karianus* 由来の二種の硝酸塩輸送体(NRT2, NRT)およびリン酸輸送体(PiT)の cDNA 部分配列に基づく推定アミノ酸配列.

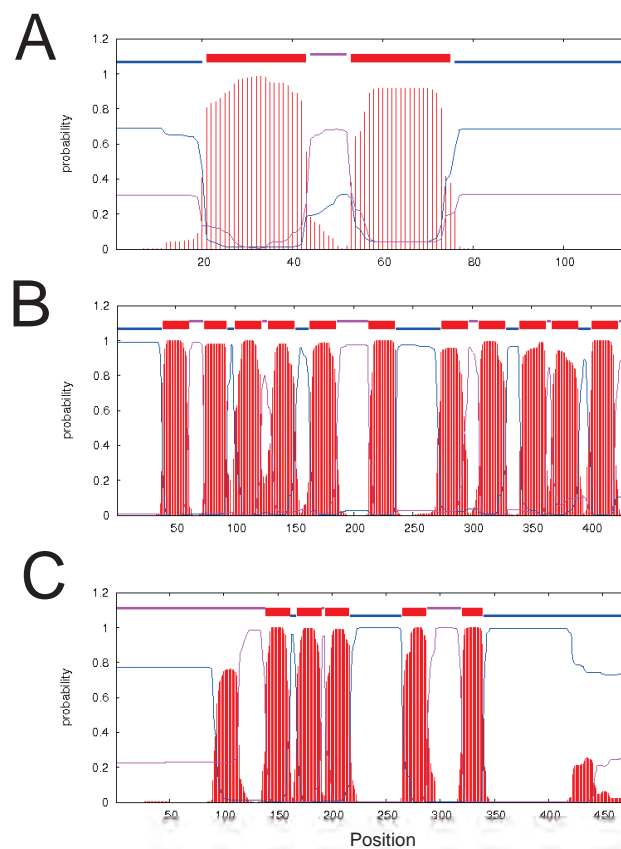


図2 *Asteroplanus karianus* の NRT2 (A), NRT (B) および PiT (C) の膜貫通領域. 青色・淡赤色の線はそれぞれ膜の内側・外側の領域を示し, 赤色のバーが膜内の領域を示す.