



Title	Studies on Growth and Toxin Production of Several Toxic Algae
Author(s)	姜, 珊珊
Citation	Nagasaki University (長崎大学), 博士(海洋科学) (2017-02-15)
Issue Date	2017-02-15
URL	http://hdl.handle.net/10069/38756
Right	

This document is downloaded at: 2019-03-25T06:14:19Z

Studies on Growth and Toxin Production of Several Toxic Algae

(数種有毒藻類の成長／増殖と毒産生に関する研究)

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 姜 珊瑚

Alexandrium 属の有毒渦鞭毛藻は、一群の神経毒（麻痺性貝毒；PST）を産生するため、異常増殖すると、それらを捕食する二枚貝が毒化し、致命的な食中毒（麻痺性貝中毒；PSP）を引き起こすことがある。一方、紅藻のハナヤナギとマクリは、それぞれドウモイ酸（DA）とカイニン酸（KA）を保有する。DA/KA は、元来、上記紅藻より虫下しの有効成分として分離された物質であるが、多量に摂取すると大脳で記憶を司る海馬の C3 領域を破壊し、記憶障害をもたらす。DA は、1987 年にカナダで発生した大規模な集団食中毒（記憶喪失性貝中毒；ASP）の原因物質でもあり、*Pseudo-nitzschia* 属の珪藻が産生した DA をムラサキイガイが摂取・蓄積して毒化し、これをヒトが食べて中毒したことが明らかにされている。PSP と ASP は世界中で水産上および公衆衛生上の脅威となっており、PST/DA の分布、食物連鎖を介した移行・蓄積、生合成経路、中毒機構などについて数多くの研究が行われてきた。しかしながら、上記有毒藻類の成長／増殖や毒産生に及ぼす環境要因の影響、あるいは毒の産生機構や生理機能については依然として不明な点が多い。本研究では、それらの解明に資するため、九州沿岸で二枚貝毒化の主要な原因となっている *Alexandrium catenella* (*Ac*) を対象に、継代培養や培地中の微量金属、単一波長光の照射が増殖と PST 産生に及ぼす影響について検討するとともに、これまでに前例のないハナヤナギとマクリの単藻培養を試みた。

まず、長崎県五島列島玉之浦湾より単離した *Ac* 株につき、改変 SWM-III 培地中、温度 20°C、光強度 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (12L/12D) で継代培養し、第 1~第 3 代培養細胞を得た。いずれも 0.5 M 酢酸で毒を抽出し、HPLC 蛍光分析で毒量と毒組成を調べたところ、*Ac* 天然細胞、第 1、第 2、および第 3 代培養細胞の毒量は、それぞれ 646、50、12、および 15 fmol/cell で、継代培養により産生毒量が大きく減少することがわかった。毒組成にも変化がみられ、C1-4、GTX1,4、GTX5 から成るよりシンプルな組成となった。一方、*Ac* 培養細胞を SWM-III 培地から微量金属を除いた培地で 16 日間培養したところ、*Ac* の増殖に際立った変化は認められなかったが、産生毒量は 2 倍以上に増加した（第 I 章）。

次に、玉之浦産 *Ac* 株につき、改変 SWM-III 培地中、温度 20°C、光強度 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (12L/12D) で青色 LED (470 nm)、緑色 LED (530 nm)、または赤色 LED (660 nm) を

照射する実験を行った。その結果、細胞密度 (Cd) は青で急速に、赤で緩やかに増加したのに対し、細胞体積 (Cv) は青で次第に減少し、赤で増加した。緑では、Cd は赤、細胞体積は青に類似した推移を示した。興味深いことに、単位培地量当たりの総バイオマス ($Cv \times Cd$) は青と赤で同程度に増加した。このことは、Ac は、青色光下では細胞数をより速く増やすことによって、赤色光下では細胞サイズをより大きくすることによって、互いに同程度に総バイオマスを増加させることを示唆する。毒産生をみると、1細胞当たりの毒量、細胞中の毒の濃度、および単位培地量当たりの毒量のいずれも赤で最も高く、次いで緑、青の順となった。バイオマスの増加が同程度であるにもかかわらず、Ac は青色光より赤色光を受けた方がより多量の毒を産生することがわかった (第II章)。

次いで、鹿児島県花瀬崎で採取したハナヤナギにつき、葉状部小枝先端を 0.1 mm 程度切り取り、改変 PES 培地 (mPES; 海水 + 窒素、リン酸、鉄、微量金属、ビタミン、HEPES)、ならびにその組成を改変した種々の培地を用いて単藻培養を試みた。その結果、ハナヤナギは、mPES 培地より、微量金属または Mn 非添加の mPES 培地で良好な成長を示したことから、本藻では過剰の Mn が成長阻害因子として作用するものと推察された。次いで、異なる 3 濃度で栄養塩を添加した N・P・Fe 培地 (海水 + 窒素、リン酸、鉄) でハナヤナギを培養したところ、相対濃度 50% で最もよく成長した (30 日間の成長率 828%)。各培養藻体の DA 含量を LC-MS で測定したところ、天然藻体の 4-5 倍 (2273-3308 $\mu\text{g/g}$) に達することがわかった。プールした培養藻体 (60 g) から分離・精製した DA (約 10 mg) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、既報のスペクトルとよく一致した (第III章)。

最後に、鹿児島県花瀬崎もしくは沖縄県石垣島で採取したマクリにつき、葉状部小枝先端を切り取り、mPES、N・P・Fe、および栄養塩無添加の 3 種の培地で単藻培養したところ、本藻は、過剰の Mn に対する感受性を示さず、オートクレーブ海水で調製した mPES 培地中で最も良く成長した (25 日間の成長率 797%)。各培養藻体の KA 含量 (1748-2378 $\mu\text{g/g}$) は、天然藻体 (1562 $\mu\text{g/g}$) より若干高く、培養藻体 (102 g) から分離・精製した KA (約 30 mg) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、既報のスペクトルとよく一致した。一方、mPES の NaNO_3 を $\text{Na}^{15}\text{NNO}_3$ で置き換えた培地 ($^{15}\text{N-mPES}$) でマクリを培養したところ、藻体中の総測定 KA 量 ($^{\text{total}}\text{KA} = ^{213}\text{KA} + ^{214}\text{KA}$) に対し ^{214}KA 量の割合 (^{214}KA 率) は、培養開始時の 0.1 から次第に増加して 6 週間後には 2.5 に達した (第IV章)。

以上、本研究では、Ac は継代培養すると大幅に毒産生能が低下すること、培地中の微量金属や照射光の波長が増殖や毒産生に大きく影響すること、などを明らかにした。さらに、ハナヤナギとマクリの単藻培養に初めて成功するとともに、ハナヤナギでは過剰の Mn が成長阻害因子として作用すること、ハナヤナギ培養藻体は DA を、マクリ培養藻体は硝酸体窒素を取り込んで KA を産生することを示すことができた。