

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580258

研究課題名(和文) 薬剤による赤潮生物の栄養細胞の殺滅機構とシストの発芽抑制機構の解明

研究課題名(英文) Determination of mechanism of red tide extinction and suppression of cyst germination by reagents

研究代表者

前田 広人 (Maeda, Hiroto)

鹿児島大学・水産学部・教授

研究者番号：80238873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：鹿児島山川湾において新規の赤潮Pseudochattella株を分離し、その性状について明らかにした。また同山川湾の底泥のシストの現存量を推定するためのDNA解析手法を確立した。その手法によって底泥中のシストの季節変化を明らかにした。そして、これらの赤潮対策として、過炭酸ナトリウムや水酸化マグネシウムにはシストの発芽効果があることを確認した。またこれらの薬剤は、栄養細胞の殺滅効果があることも確認した。とりわけ、過炭酸ナトリウムにおいては、0.1g/lで30分で効果があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：As a novel red tide plankton, Pseudochattella sp. was isolated and its characteristics were determined. At the same time, detection methods of cyst DNA were established. By using these methods, seasonal change of the cyst concentration in the sediment of Yamakawa bay was estimated. For red tide suppression measures, sodium percarbonate and magnesium hydroxide have been performed to be effective for cyst germination. They were simultaneously effective for extinction of the vegetative cell. It is particularly clear that sodium percarbonate is effective for the extinction under 0.1g/l within 30 minutes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：赤潮 シスト 有害藻類 殺滅機構 発芽抑制

1. 研究開始当初の背景

我が国ばかりではなく世界的に、水産養殖にとって、赤潮は依然としてもっとも大きな脅威である。2010年6月、八代海、有明海および橘湾でシャトネラ赤潮が発生し、養殖魚の斃死などで約58億円の甚大な被害をもたらした。今後このような赤潮が頻発すれば、この地域の養殖業は崩壊の恐れがあるとして、長崎県、熊本県および鹿児島県の知事から本学に向けて、赤潮に対する対策技術の確立を希求する要望書が寄せられた(2010年8月)。赤潮を発生させないためには、富栄養化をくいとめることがもっとも重要であることは明らかであるが、現実的にはほとんど不可能に近い。このような富栄養化した環境で養殖業をおこなうことは、業者にとって常に赤潮による魚の大量斃死のリスクを負うことになっている。そこで、今もっとも求められていることは、緊急避難的な手段によっても、一時的に赤潮を軽減して魚の大量斃死を防ぐ方法である。

2. 研究の目的

これまで、赤潮に対する緊急避難的な対処法として、薬剤処理(水酸化マグネシウムや酸化チタンなど)による赤潮生物の駆除が有効であり、同時にシストの発芽を抑制できることを見いだした。しかし、どのような機構で作用し、その効果の大小が、何に起因しているのかはいまだに明らかにしていない。そこで本申請研究では、様々な細胞生理学の手法を取り入れて、水酸化マグネシウムや酸化チタンなどの赤潮駆除剤としての殺滅機構とシストの発芽抑制機構の解明に取り組み、効果の向上を目指す。

3. 研究の方法

水酸化マグネシウムや酸化チタン等と併用による赤潮駆除剤としての殺滅機構の解明のために、培養株の活性酸素を測定する系を作り、活性酸素と運動性喪失などの関係を明らかにして、効果を適切かつ定量的に評価する手法を確立する。その手法をもちいて、水酸化マグネシウムや酸化チタン以外の薬剤との組み合わせを検討し、さらに効果的な赤潮駆除剤の開発に取り組む。また、上記の測定系を用いて、シストの発芽抑制機構を解明し、抑制効果の向上を目指す。

4. 研究成果

4.1 現場調査: 本研究では定期観測として、山川湾と八代海に於いて赤潮調査を実施した。その中で、八代海においては、際だった赤潮は発生しなかった。山川湾においては *Pseudochattonella* の赤潮が発生し、約1千万円の漁業被害が出た。現場観測の結果、夏期の山川湾は成層構造が強固であることを明らかにすると共に(図1、2)、現場海域より *Pseudochattonella* を分離し、遺伝子解析を行った。

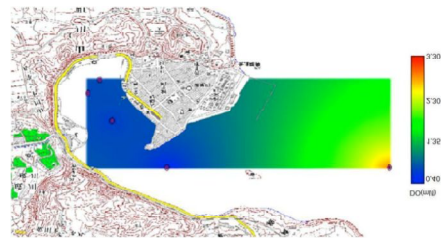


図2.8月の山川湾の海底の溶存酸素の水平分布。

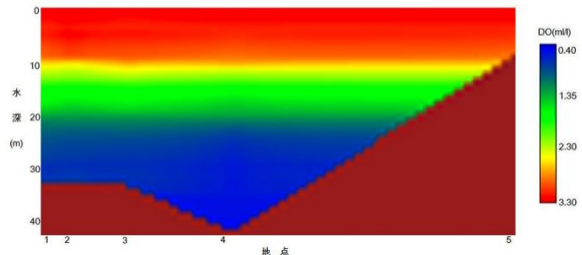


図2.8月の山川湾の溶存酸素の鉛直分布。水深10mより以深では貧酸素になっていることを示す。

さらに、16S リボソーム遺伝子の配列を決定して既存の株との比較を行った結果、瀬戸内海の株との近似性が高いことを明らかにした。また、山川湾の底泥を定期的に調べた結果、赤潮発生前には、シストの現存量がことを明らかにした(写真1、写真2)。

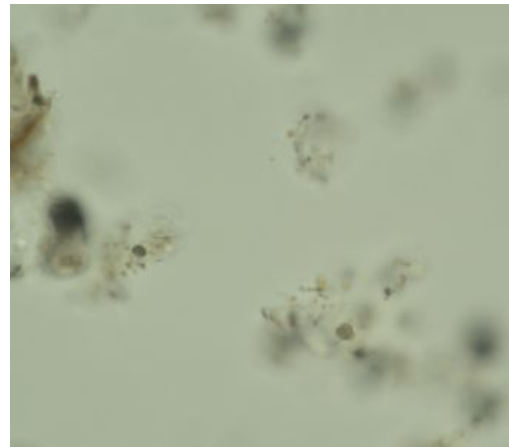


写真1.山川湾底泥のシスト(光学顕微鏡400倍)

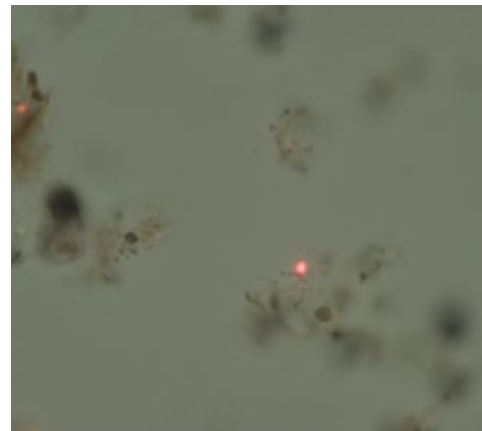


写真2.山川湾底泥のシスト(上記の写真に落射蛍光画像を重ねたもの。赤く輝いているのがシスト)

また独自に作成したプライマーによって、シスト DNA が検出されることを明らかにした(図2)。本技術の確立によって赤潮の予察に利用できる可能性が示唆された。

また、八代海では *Chattonella* 赤潮が発生しなかったものの、採取した底泥から *Chattonella* に由来する DNA を検知することができた。このため、今後八代海における赤潮の予察にも本手法が利用できる可能性が示唆された。

4.2 室内実験：赤潮生物の栄養細胞に対しても、シストに対しても、過炭酸ナトリウムと水酸化ナトリウム殺滅効果があることを明らかにした。特に過炭酸ナトリウムでは 0.1g/l で 30 分以内に効果が現れることを明らかにした。これは既存の赤潮駆除剤としてはもっとも低濃度で効果が期待できるものである。本法は現場における赤潮駆除に応用できる濃度であるので、他の生物への影響や実際に流れのある状況での効果の検証など、今後さらなる現場実験が必要である。殺滅機構については、PAM(光合成活性測定装置)による光合成活性を測定した結果、この薬剤投入時に光合成活性値が極端に低下する現象をとらえることに成功した。光合成活性と運動性の喪失がほぼ同時に起こることから、活性酸素による光合成系の代謝阻害の可能性が示唆された。細胞内の活性酸素を測定する方法を模索したが、測定には至っていない。

一方、養殖場などで残餌が堆積し、底泥から栄養塩が溶出しやすい環境では、底質の改善が必要であるが、本研究では酸化マグネシウムを用いた底質改善を検討した。その結果、本法によって、底質指標が改善され(図3)、同時に底泥中の微生物相が変化することを DGGE 法によって明らかにすることができた(図4)。

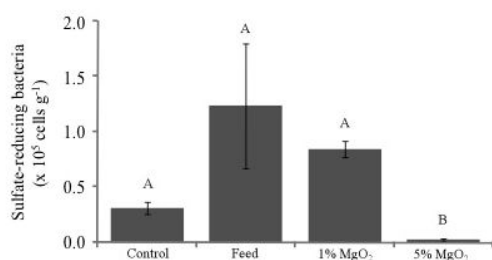


図3.底泥の硫化物濃度の変化。酸化マグネシウムの添加によって(5%)、底質の悪化の指標である硫化水素の生成が抑制されたことを示す。

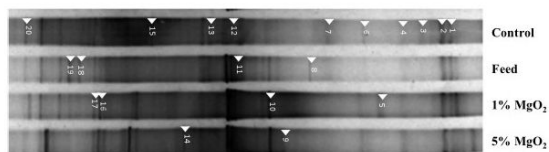


図4.上記の底泥中の細菌相の DGGE パターン。酸

化マグネシウムの添加によって(1%および5%)、細菌層の多様性が大きいことを示す。

また、本研究(科研費)の数年前より水酸化マグネシウムが赤潮駆除剤として有効であることを特許出願し審査を重ねてきたが、昨年、特許取得に至っている。さらに、この水酸化マグネシウムがシストの発芽を抑制することも追加特許として申請中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- Mio Takeuchi, Taiki Katayama, Takao Yamagishi, Satoshi Hanada, Hideyuki Tamaki, Yoichi Kamagata, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Katsumi Marumo, Munetomo Nedachi, Hiroto Maeda, Yuichi Suwa, and Susumu Sakata, *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively methyl-otrophic bacterium isolated from marine sediments near the hydrothermal vent area, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.64, pp. 462-468 (2014) 査読有。
- Sheila Mae S. Santander-De Leon, Suguru Okunishi, Masaki Kihira, Miyo Nakano, Sharon N Nunal, Masayasu Hidaka, Takeshi Yoshikawa, Hiroto Maeda, Characterization of the Bacterial Community in the Sediment of a Brackish Lake with Oyster Aquaculture, *Biocontrol Science*, Vol.18, No.1, pp.29-40 (2013) 査読有。
- Sheila Mae S. Santander-De Leon, Suguru Okunishi, Masaki Kihira, Miyo Nakano, Sharon N Nunal, Masayasu Hidaka, Takeshi Yoshikawa, Hiroto Maeda, Effect of Magnesium Peroxide Biostimulation of Fish Feed-loaded Marine Sediments on Changes in the Bacterial Community Shift, *Biocontrol Science*, Vol.18, pp.41-51 (2013). 査読有
- 高正康・西隆一郎・前田 広人・内山正樹・福田隆二, 池田湖の底質環境の経年変化, 土木学会論文集 B3(海洋開発), Vol.69, No.2, pp.1_904-1_909 (2013). 査読有
- Ishino R., S. Iehata, M. Nakano, R. Tanaka, T. Yoshimatsu, and H. Maeda, Bacterial diversity associated with the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex determined by culture-dependant and -independant methods, *Biocontrol Science*, Vol.17, No.1, pp.51-56 (2012). 査読有
- Nakano Miyo, Shunpei Iehata, Reiji Tanaka, Hiroto Maeda, Extracellular Neutral Lipids Produced by the Marine Bacteria *Marinobacter* sp., *Biocontrol Science*, Vol.17, No.2, pp.69-75 (2012).
- Okunishi S., Y. Morita, T. Higuchi, H. Maeda and K. Nishi, Transformation of microflora during degradation of gaseous

toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE, Journal of the Air & Waste Management Association, Vol.62, No.7, pp.748-757 (2012). 査読有

8. Yang Li, Wei Hongyi, Masaharu Komatsu, Kenichi Ishibashi, Lin Jinsan, Tatsuo Ito, Takeshi Yoshikawa and Hiroto Maeda, Isolation and characterization of bacterial isolates algicidal against harmful Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, Biocontrol Science, Vol.17, No.3, pp.107-114 (2012). 査読有

9. Yoshikawa T., Hayakawa N., Akase S., Maeda H. and Sakata T., Development of RDPD and STS markers in a red tide-causing raphidophyte *Heterosigma akashiwo*., DNA多型, Vol.19, pp.308-315 (2011). 査読有

10. Nakano M., Kihira M., Iehata S., Tanaka R., Maeda H., and Yoshikawa, Wax ester-like compounds as biosurfactant produced by *Dietzia maris* from n-alkane as a sole carbon source., Journal of Basic Microbiology, Vol.51, pp.1-9 (2011). 査読有

11. Yoshikawa T., Y Ikeda, T. Sakata, H. Maeda, Cloning and analysis of the *ggpS* gene from cyanobacteria *Arthrospira* spp. involved in the synthesis of an osmolyte glucosylglycerol., Biocontrol Science, Vol.16, No.2, pp.55-61 (2011). 査読有

12. 加藤進, 紀平征希, 小林康志, 八木田浩史, 前田広人, 伊賀市におけるBDF製造によるCO₂発生量削減試算 -CO₂発生係数による簡易試算の試み-, 環境技術, Vol.40, No.9, pp.553-558 (2011). 査読有

[学会発表](計 8件)

1. Hiroto Maeda, Marine biomass project in tropical and sub-tropical area, the JSPS Core University Final Seminar, 2012年 11月 (Iloilo Grand Hotel, Iloilo City, Philippines).

2. Sharon N. Nuñal, Sheila Mae Santander-De Leon, Takeshi Yoshikawa, Hiroto Maeda, Enhanced bioremediation of heavy oil-contaminated sediment by combination of biostimulation and bioaugmentation strategies, CER International workshop on Biogeochemical cycling and Microbial Ecology for Young Scientists, 2013年 3月 (大津 京大大学生態学研究センター).

3. Erika NAKASHIMA, Hiroto MAEDA, Izuru SENAHA and Kunihiro TAKEDA, REGENERATION SYSTEM OF CARBON DIOXIDE USING ALGAE, IMPRES2013(九州大学), 2013年 9月 (Kyushu)

4. 魏弘毅, 吉川毅, 前田広人, Biocontrol of pathogenic root fungus, 日本防菌防黴学会, 2013年 9月 (大阪 千里ライフサイエンスセンター).

5. Sharon N. Nuñal, Sheila Mae Santander-

De Leon, Takeshi Yoshikawa, Hiroto 日本防菌防黴学会, 2013年 9月 (大阪 千里ライフサイエンスセンター).

6. 前田広人, シンポジウム「赤潮をどこまで予測できるか」増殖環境保全のための赤潮モニタリングおよび対策法の高度化, 日本微生物生態学会, 2013年 11月 (鹿児島大学稲盛会館).

7. 前田広人, 水と生活 ~南九州における赤潮およびアオコ等による水環境汚染について~, 日本学術会議九州・沖縄地区会議主催学術講演会「かごしまの水を考える - 鹿児島大学「水」研究最前線 -」, 2013年 11月 (鹿児島大学稲盛会館).

8. 堀 英美子, 吉川 毅, 吉永 拓真, 沖園 雄平, 前田 広人, 葉緑体DNAマーカーによる赤潮原因藻 *Chattonella marina* 検出法の開発, 日本微生物生態学会, 2013年 11月 (鹿児島大学郡元キャンパス).

[図書](計 2件)

1. Erika NAKASHIMA, Hiroto MAEDA, Izuru SENAHA and Kunihiro TAKEDA, Regeneration System of Carbon Dioxide Using Algae, Innovative Materials for Processes in Energy Systems・TOUKA SHOBO (ISBN978-4-88757-173-0), pp.378 (2013).

2. 前田広人, バイオビジネスにおける善玉と悪玉, 地域経済情報, No.267, pp.43 (2012).

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 土壌伝染性病害防除剤及びそれを用いた土壌伝染性病害防除方法
発明者: 前田広人・吉川毅・坂口繁明・魏弘毅

権利者: 鹿児島大学

種類: 特願

番号: 特願 2013-173440

出願年月日: 2013年 9月 8日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称: 赤潮駆除方法

発明者: 前田広人・木下弘美・平井ともか

権利者: 前田広人・木下弘美・平井ともか

種類: 特許

番号: 第 5415674 号

取得年月日: 2013年 11月 22日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者 前田 広人 (MAEDA Hiroto)
鹿児島大学・水産学部・教授
研究者番号: 80238873

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし