

RF-066 個体群分子タイピングによる有毒微細藻類の人為的グローバル化の実体解明手法の開発

(1) 有毒微細藻類の個体群分子タイピング技術の開発に関する研究

独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

赤潮環境部有毒プランクトン研究室

長井 敏・西谷 豪

赤潮環境部赤潮生物研究室

坂本節子

<研究協力者>

東京大学アジア生物資源環境研究センター 練 春蘭

高知大学農学部

山口晴生

(独) 水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

神山孝史

静岡県水産技術研究所

松浦玲子

三重県科学技術振興センター

畑 直亜

香川県赤潮研究所

吉松定昭・大山憲一

大分県水産試験場

久留浩一郎・宮村和良

National Fisheries Research and

Development Institute in Philippines

E. F. Furio・U. M. Montojo

平成18～19年度合計予算額 13,457千円

(うち、平成19年度予算額 5,959千円)

※上記の合計予算額には、間接経費 3,106千円を含む

[要旨] 有毒微細藻類の個体群分子タイピング技術の開発に関する研究ということで、2006-2007年の2年間にわたり、6種類の有害・有毒微細藻類の分子タイピング技術の開発に取り組んだ。個体群分子タイピング技術の骨子となる高度多型分子マーカーの開発において、個体ごとに高度の多型性を示すマイクロサテライトマーカー（以下MSマーカー）の開発を実施した。このうち *Chattonella ovata* と *Heterocapsa circularisquama* の2種については、それぞれ12および15個のMSマーカーを開発し、個体識別が可能な分子タイピング技術の開発に成功した。いずれの種のMSマーカーも良好なPCR増幅が確認され、また、個体群構造を解析するために十分な多型性が得られた。このうち、*H. circularisquama* については、地方集団の間に有意な集団分化が見られ、また、人為的な要因によると思われる個体群の移送過程の存在が示唆された。さらに、特筆すべき事項として、プランクトン有史以来、培養が不可能と考えられていた下痢性貝毒原因種である *Dinophysis* 属の2種 (*D. acuminata* と *D. fortii*) が培養可能となり、それぞれ多数の培養株を確立することに成功した。特に *D. fortii* については、現時点で世界初の快挙であり、今後、これまで不明であった増殖生態、特に毒生産生理などの研究が進むことにより、世界的に注目される研究になると予想される。*D. acuminata* および *Gymnodinium catenatum* の2種についても、2～3個の多型を有するMSマーカーの開発に成功した。開発したマーカーは少ないが、これらのマーカーを用いた解析により、有意な集団分化を示したことから、今後、MSマーカーの数を増やすことにより、個体群分子タイピングが可能となると期待できる。今後、さらに多くの海域から培養株を分離し、個体

群分子タイピング技術の開発に全力を注ぐとともに、各種の遺伝子型のデータベース化や個体群構造の解明に務めたい。

[キーワード] グローバル化、個体群構造、マイクロサテライト、分子タイピング技術、有害・有毒プランクトン

1. はじめに

生物多様性を維持するため、我が国でも平成17年6月1日に「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」が施行され、外来種、移入種による被害や生態系の攪乱について積極的な取り組みが求められている。微細藻（植物プランクトン）など海洋微生物においては、現在は「特定外来生物法」の対象外となっているが、世界各地で新奇の有害・有毒微細藻が海産ほ乳類の大量斃死や食用貝類の毒化現象を引き起こして、新たな環境問題となっている。

これら有害・有毒微細藻類の出現のグローバル化については、船舶のバラスト水による原因種の移送が要因のひとつとして推測されている。バラスト水に対する規制としては、国際海事機関（IMO）によって2004年2月に採択された「船舶のバラスト水及び沈殿物の規制及び管理のための国際条約」が暫定的に締結され、他国の管轄区域を航行する船舶は、バラスト水管理（バラスト水洋上交換又はバラスト水処理）を実施することを義務づけられる。近い将来、バラスト水対策が求められる状況の中、依然これらの有毒微細藻類の分布拡大は続いており、それらの伝搬ルート解明や蔓延阻止については必ずしも実効性を伴っていないのが実情である。この原因として、バラスト水中の有害・有毒微細藻類のモニタリング技術や、水産種苗の移植、木材や海砂の運搬等を介した国内外での移送について、実態を把握する手法やマニュアルが確立していないことが指摘されている。このような状況の中、有毒微細藻類の個体群を識別する技術、移入・侵入種を判別する技術の開発が望まれてきた。

有毒微細藻類は形態学的な差異が極めて少なく、顕微鏡観察に基づいた形態判別では種判別技術に熟練が要求される。さらに、同一種内で異なる海域に分布する個体群間の類縁関係を明らかにし、新たな海域への移入等を解明する手法は、形態学的手法では達成不能である。この目的を達成するためには、高度多型分子マーカーを用いて各個体及び個体群をタイピングするといった集団遺伝学的手法の導入が最も有効であると考えられるが、これまで有毒微細藻類の個体群構造について遺伝子解析を行い、それらの情報に基づいた地域個体群の遺伝的交流（海域間移動）を証明した報告はほとんどない。

2. 研究目的

本研究では、有害・有毒微細藻類の出現のグローバル化するメカニズムを解明する手法として、日本の各地域沿岸域に分布する各種個体群について、多型分子マーカーを用いて識別・タイピングする技術開発を行い、データベース化を目指す。また、個体群の海域間移動の有無、その要因を解明するための研究手法を確立する。平成18年度は、有害・有害渦鞭毛藻・ラフィド藻である *Chattonella ovata*、*Dinophysis fortii*、*Dinophysis acuminata*、*Gymnodinium catenatum*、*Heterocapsa circularisquama*、*Pyrodinium bahamense* var. *compressum* の計6種について高度多型分子マーカーであるマイクロサテライトマーカー（以下、MSマーカー）を開発する。1、2の海

域から分離・確立した各種25-45株程度を用いて、開発したマーカーの多型性やPCRの増幅効率などの性能を評価し、個体群識別・タイピング手法を確立する。各種個体群内の遺伝的多様性や個体群間の遺伝子流動の程度を集団遺伝解析用のソフトを用いて解析し、遺伝子流動が見られる場合、その要因について明らかにする。

3. 研究方法

共同研究者の協力により、各種栄養細胞が含まれる天然海水サンプルを入手し、マイクロピペット洗浄法により各種1細胞ずつピペットで分取することにより、クローン培養株を確立した(表1)。MS領域の単離用のための栄養細胞の培養は、300mLの三角フラスコ中に150mLのf/2培地¹⁾を入れて行い、分析用の培養は、50mL用の三角フラスコに30mLの培地を入れて行い、対数増殖期後期の細胞を集藻した。DNAの抽出はDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)あるいはCTAB法²⁾を用いて行った。MSマーカーの単離方法はNagai et al.³⁻⁶⁾、Lian et al.⁷⁾およびNishitani et al.^{8,9)}に準じて実施した。開発した各MSマーカーの特徴を把握するため、haploid種である*H. circularisquama*については40株以上、diploid種である*Chattonella ovata*については、20株以上のクローン培養株を用いて、対立遺伝子の出現頻度、遺伝子多様度など多型性を評価、PCR増幅のチェックを行った。なおMSマーカー間の連鎖分析(Linkage disequilibrium)などの集団遺伝学的パラメータは、GENEPOP¹⁰⁾やPOPGENE¹¹⁾、GENALEX¹²⁾、TFPGA¹³⁾を用いて計算した。

表1. 分子タイピング技術開発の進捗状況の一覧

種類	MSマーカー 開発用培養*	培養株	サンプリング海域	MSマーカー 開発**	MSマーカー数 **	タイピング技術***
<i>Chattonella ovata</i>	○(4株)	93	広島湾, 兵庫県播磨灘, 三重県五ヶ	○	12	○
<i>Dinophysis acuminata</i>	○(4株)	80	広島湾, 大分県猪串湾	○	3	○
<i>Dinophysis fortii</i>	○(4株)	>100	広島湾, 熊本県八代海, 鳥取市沿岸	△	3	△
<i>Gymnodinium catenatum</i>	○(4株)	81	大分県猪野串湾, 山口県仙崎湾, 熊本県宮野河地湾	△	2	○
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	○(4株)	125	英虞湾など12海域	○	15	○
<i>Pyrodinium bahamense</i>	○(4株)	4	フィリピン	X	0	X

*, マーカーの開発に最低限必要な培養株数; **, ○:開発成功; △:開発中; X, 中止***, 個体毎に遺伝子型のタイピングが可能になった場合 ○:開発成功; △:開発中; 中止

4. 結果・考察

(1) 培養株の確立

標記6種について、複数の海域から海水を採集し、それぞれクローン培養株を確立した(表1)。

(2) 個体群識別・タイピング手法の確立

- 1) *C. ovata*はラフィド藻シャトネラ属の1種であり(図1)、体長は50-70 μmで、日本、中国、メキシコなどで出現が確認されており、魚類斃死を引き起こす。日本においては、1980年代から出現は確認されているが、本種による最初の漁業被害は2004年に香川県で報告されている¹⁴⁾。今回、*C. ovata*から抽出したDNAからCompound SSR primer法⁷⁻⁹⁾によりMS領域を単離した。MS領域を選択増幅したPCR産物から1,232個のシーケンス配列を読み、173個のプライマ

ーを設計し、良好なPCR増幅が認められた21個のマーカーのうち、12個の多型を有するMSマーカーを得た。各マーカーの特徴を調べた結果、PCR産物が得られなかったサンプル数は0-3の範囲にあり、いずれのマーカーも良好なPCR増幅を示した。アレル数は4-10 (6.2 ± 2.7 、平均 \pm 標準偏差、 $n=21$) の範囲、ヘテロ接合度の観察値および期待値はそれぞれ $0.250-0.850$ (0.461 ± 0.198 ; 平均 \pm 標準偏差) 、 $0.310-0.889$ (0.563 ± 0.179) の範囲にあった。2つのマーカー (Covata45とCovata162) でハーディーワインバーグ平衡からの有意なずれが検出された。また、マーカー間で有意なリンケージは検出されず、以上から本種の集団解析に使用可能な12個のマーカー開発に成功した (表2、図2)。

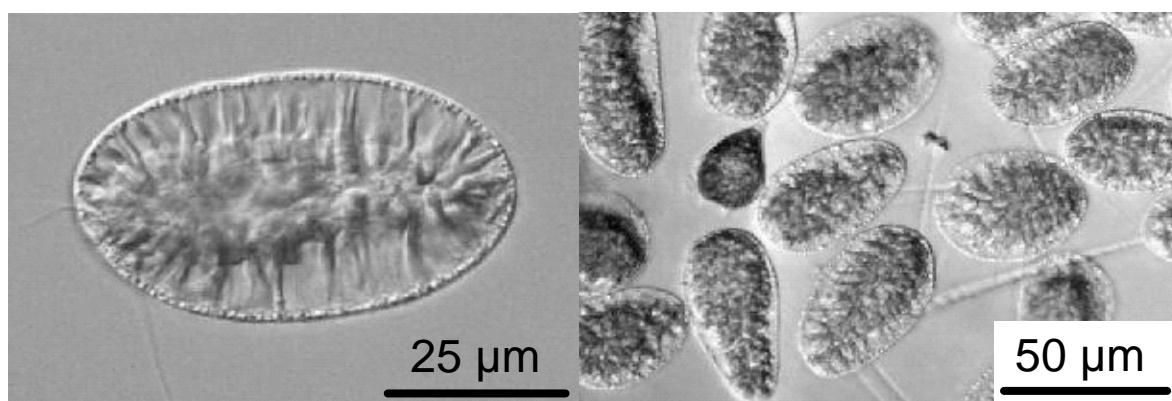


図1. *Chattonella ovata*の遊泳細胞

表2. 有害ラフィド藻 *Chattonella ovata* における12個のMSマーカーの開発と各マーカーの特徴 (21個のクローン培養株を用いて解析)

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5' -3')	T _a (°C)	No. of non-amplifying samples	No. of alleles	Size range (bp)	H ₀	H _E	F _{IS}	GenBank Accession no.
Covata02	(AC) ₅ (TC) ₁₂	ACACACACTCTCTCTCTCTC GGAATTGGTGTGACATGAACG	56	1	5	153-161	0.500	0.673	0.238	AB295442
Covata36	(AC) ₆ (AG) ₉	ACACACACACAGAGAGAGAG GCCTTCTGAAGTTTCCTCCATC	56	2	4	77-83	0.368	0.559	0.323	AB295443
Covata37	(AC) ₆ (AG) ₈	ACACACACACAGAGAGAGAG CCCTAAGGTACCTTTACGAAGTGG	56	1	8	96-105	0.450	0.565	0.184	AB295444
Covata45*	(TC) ₆ (AC) ₅ (C) ₂ (AAAG) ₄ (AAAAG) ₃	TCTCTCTCTCACACACACAC CCTTACATCTTCACATCATGC	54	0	12	124-168	0.476	0.889	0.451	AB295445
Covata98	(AC) ₆ (AG) ₉	ACACACACACAGAGAGAGAG GCTCATTTGATGATCTCCTCAG	56	0	4	67-73	0.238	0.362	0.327	AB295446
Covata102	(AC) ₆ (AG) ₇	ACACACACACAGAGAGAGAG TTTGACCAATCGTCTGCTAG	56	1	4	199-202	0.850	0.568	-0.535	AB295447
Covata129	(AC) ₆ (AG) ₁₀	ACACACACACAGAGAGAGAG GAGGATACCACAACTTGCTG	56	1	10	63-93	0.450	0.683	0.325	AB295448
Covata132	(AC) ₆ (AG) ₁₀	ACACACACACAGAGAGAGAG ACCGCAAACACTGTCCTGTACC	56	0	5	110-122	0.333	0.434	0.214	AB295449
Covata156	(AC) ₆ (AG) ₁₀	ACACACACACAGAGAGAGAG GGATGGAGAAGTCAACGATG	54	2	7	124-138	0.526	0.585	0.075	AB295450
Covata162*	(AC) ₆ (AG) ₁₂	ACACACACACAGAGAGAGAG GTTTGTGCTAGGTACAGATTGC	58	0	7	89-105	0.810	0.784	-0.058	AB295451
Covata171	(AC) ₆ (AG) ₅ CT(CAA) ₅	ACACACACACAGAGAGAGAG AGATTTCCTAGCACCTCCAATG	58	1	4	176-194	0.250	0.310	0.174	AB295452
Covata173	(AC) ₆ (AG) ₁₀	ACACACACACAGAGAGAGAG CAGGACGATGATTCGAAGTGC	54	3	4	88-96	0.278	0.344	0.171	AB295453

T_a, 各プライマーのアニーリング温度; H₀, ヘテロ接合度の観察値; H_E, ヘテロ接合度の期待値; F_{IS}, inbreeding coefficient; * ハーディーワインバーグ平衡からの有意なずれ ($P < 0.05$).

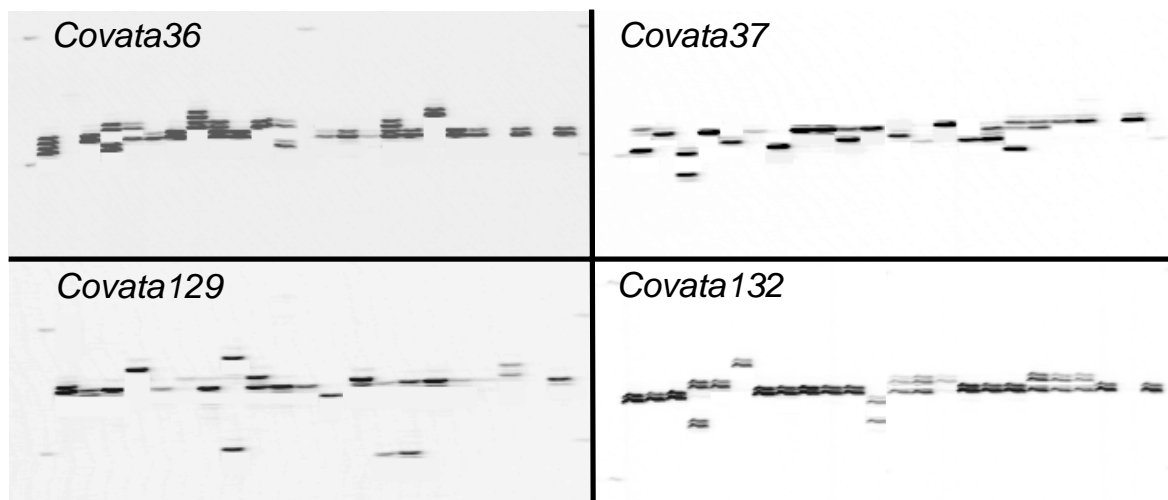


図2. 開発したMSマーカーによるPCR産物の電気泳動像 (分析個体数=21) 6%ポリアクリルアミドゲル使用

No.	genotype
1.	BCABDHGAAACEFCCEFADBBBC
2.	EE. . GGGGAAAEECCCAEBCCC
3.	ABBACDDAAAEECCCGAGBBCC
4.	BCACGGAAABADG IADBCABBCC
5.	BBBCEGBGAAAEEDDBCFFBBCC
6.	CCBBGGHAA. . GGCE. . AEBB. .
7.	BEBDDCJAAAECCBGAEBBCC
8.	BCCDGGGBBAACJCCACAEBBAC
9.	ABBCGGGAAACEGCCACFFBCCC
10.	BDBBEGDDAAADAEECCDFABBC
11.	BCCCGGHIADAEECCCAEBBCC
12.	. . AC. . DGBBADDABCCAEBBCC
13.	BBBEGBGAAAD. . CDCCEBC. .
14.	BCBCGGJJABADFFCCCF AEBBCD
15.	BBBBDGBHAAADBECCACDFBBB
16.	BBDDDFGKACADBECCCF AEBBCD
17.	BEBBBGCFAAAEEDCCAGBDCC
18.	EEBBFGEEAADEECDCBCECC. .
19.	CC. . GGCFAAADEECD. . FF. . CC
20.	EEBBGGHHABBDHFCCFF AEBBCC
21.	BBBGGLLAAAEEDCCCGAGBBCC



図4. *Chattonella ovata*のサンプリング地点
カッコの中の数字は、確立したクローン培養株数

図3. 開発したMSマーカーによる分子タイピング (全21サンプル)
図中のピリオドは欠失サンプルを示す

表2. *Chattonella ovata* 4個体群のMSマーカーによる解析結果

個体群	サンプリング	N	A	Ho	He	PA	Fis	HW
広島湾	海水	9	5.4	0.90	0.76	0.22	-0.82	0.0230
広島湾	海底泥	8	4.7	0.83	0.71	0.13	-0.27	0.3052
播磨灘	海水	40	6.7	0.82	0.71	0.25	-0.18	0.0009*
五ヶ所湾	海水	36	6.7	0.79	0.74	0.14	-0.10	0.0009*

N, 分析株数; A, 1遺伝子座あたりの対立遺伝子数; Ho, ヘテロ接合度の観察地;
He, ヘテロ接合度の期待値; PA, 1株あたりの個体群特異的な対立遺伝子数; Fis, 固定指数(個体群の遺伝的な偏りを示す指数); HW, ハーディーワインバーク平衡からの統計学的なずれを検定した; *, P<0.05

図3のように個体ごとに遺伝子型を決定したところ、今回用いた全ての個体間で遺伝子型が異なったことから、本研究により開発したマーカーは、個体ごとの分子タイピング、個体群間での遺伝子構造の比較にも有効なマーカーであることが判明した。3海域（広島湾2地点、播磨灘、五ヶ所湾）からそれぞれ9、8、40、36のクローン培養株（合計93株）を確立した（図4）。良好なPCR増幅が認められた7個のマイクロサテライトマーカーを用いて多型解析を行った。その結果、アリル数は5-11（ 8.0 ± 2.9 、平均±標準偏差、 $n=93$ ）の範囲、ヘテロ接合度の観察値および期待値はそれぞれ0.38-0.98（ 0.82 ± 0.20 ）、0.55-0.77（ 0.73 ± 0.08 ）の範囲にあった（表2）。個体群として見ると、播磨灘と五ヶ所湾でハーディーワインバーグ平衡からの有意なずれが検出された。Fisher's exact testの結果、いずれのペア個体群間においても、有意な集団分化は検出されなかった（表3）。PCAによる主成分分析¹²⁾の結果から、第1と第2、第1と第3主成分のXYプロットを行ったが、プロットパターンの個体群による明瞭な差異は見られなかった（図5）。

表3. Fisher's exact testの結果. 表中の数字はP値を示す

	広島湾	広島湾泥cyst	播磨灘	五ヶ所湾
広島湾				
広島湾泥cyst	0.88			
播磨灘	0.83	0.52		
五ヶ所湾	0.62	0.65	0.31	

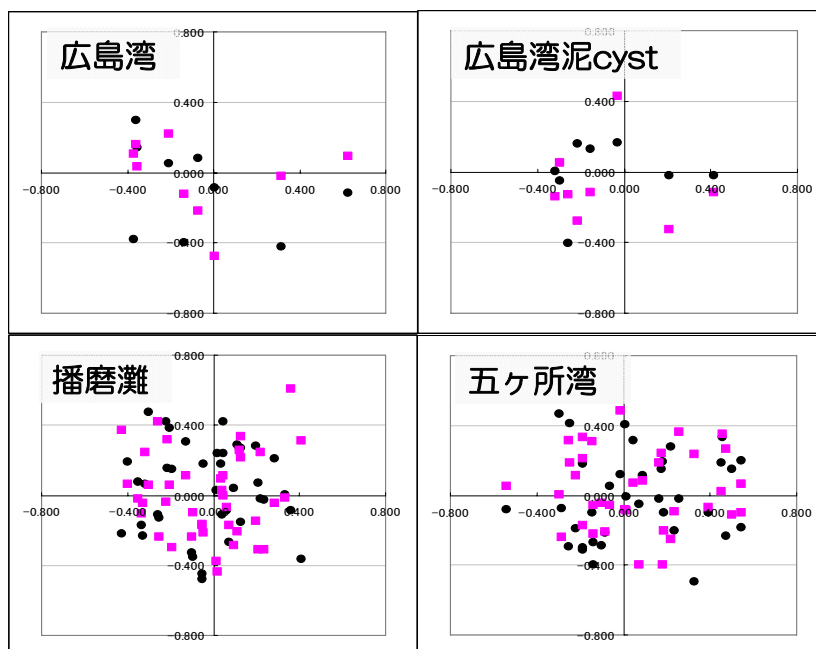


図5. GENALEX¹²⁾による主成分分析の結果を示す。各個体群の全個体のデータの結果をプロットした。●, 第1+第2主成分; ■, 第1+第2主成分

また、UPGMA法によりデンドログラム¹³⁾を作成したが、個体群間の遺伝距離は小さい値を示した(図6)。以上の結果は、本種の個体群間で遺伝的な構造化・遺伝的分化が見られないことを示している。播磨灘の個体群は、紀伊半島に沿って五ヶ所湾から流れてきたことが確認されており、同じ起源の個体群であるため、遺伝的に差が出ないのは説明がつく。*C. ovata*は、20年くらい前から日本での出現は確認されているが、2004年に瀬戸内海で初めて赤潮を形成したような状況にあり、日本国内の個体群についてはまだ遺伝的に未分化の種と考えられる。本種は、既に中国・メキシコ沿岸でも赤潮形成により大量の魚介類斃死が確認されており、今後、さらに分布を拡大させる懸念があり、より多くの海域の個体群の解析を行い、データベースを充実させておく必要がある。

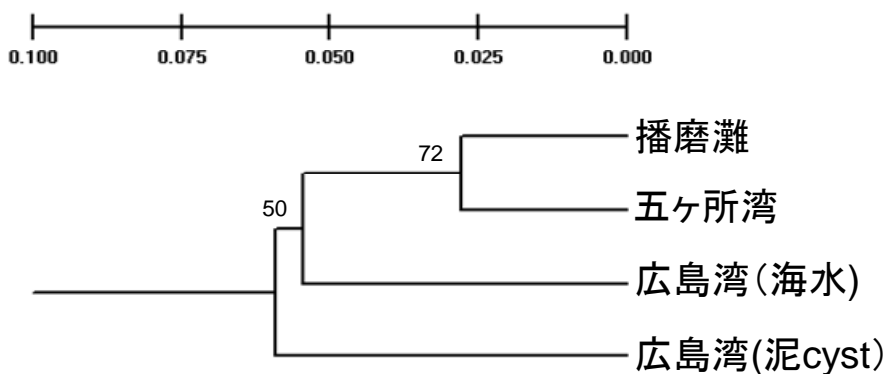


図6. UPGMA法によるデンドログラム¹³⁾。図中の数字はブートストラップ値を示す。
>50%の値のみを示した。

2) *D. acuminata*は、渦鞭毛藻*Dinophysis*属の1種であり、体長は40-50 μm で、ほぼ世界沿岸各地の至る所に分布する下痢性貝毒原因種である。植物プランクトンの研究が始まって以来これまで、*Dinophysis*属の培養については、世界の多くの研究者が挑戦してきたにもかかわらず、誰1人として長期培養に成功しなかった。そのため本属の増殖生理学・毒生産に影響を及ぼす培養諸条件の影響に関する情報などを得ることができなかった。しかし、Park et al.¹⁵⁾は、世界で初めて*Dinophysis*属の1種*D. acuminata*の培養に成功した。*Dinophysis*属は基本的に従属栄養性を示すと考えられていたが、餌生物が長い間不明であった。Park et al.¹⁵⁾は小型クリプト藻の1種*Teleaulax* sp. を餌として繊毛虫*Myrionecta rubra* (Ciliophora) の培養を行い、*M. rubra*を餌として*D. acuminata*に与えることにより培養に成功した。少し遅れて、昨年度、東北海区水産研究所の神山孝史博士も*D. acuminata*の培養に成功した。現在、共同研究として、本課題担当者(長井ら)も、本種の高密度培養に成功した(図7-A、B)。*D. acuminata*のMSマーカーの開発については、448個のシーケンス配列を読み、64個のプライマーを設計し、PCR増幅が認められた11個のマーカーについて蛍光を付加し、広島湾から単離・培養後、DNA抽出をした47個のDNAサンプルを用いて、多型性とPCR増幅を調べた結果、PCR増幅が良好で、かつ高度の多型性を示したのは3個のマーカーのみであった(表4)。今後さらに、マーカーの数を増やす必要があるが、とりあえず2個のMSマーカーを用いて(図8)、広島湾と大分県猪串湾の個体群(2007年35株確立)において、Fisher's exact testを行った結果、有意な遺伝的分化を示すことが判明した。従って、今後、さらにMSマーカーの数を

増やすことにより、個体群分子タイピング技術が有効となり、日本の個体群の遺伝的構造とそれに影響を及ぼす要因が解明されると期待できる。

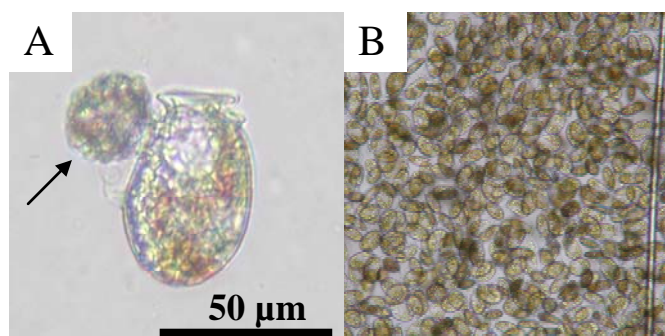


図7. *Dinophysis acuminata*の培養
A, 摂食中の*D. acuminata*; B, *D. acuminata*の集藻の様子。矢印は*Dinophysis*の餌 (*Myrionecta rubra*) を示す。

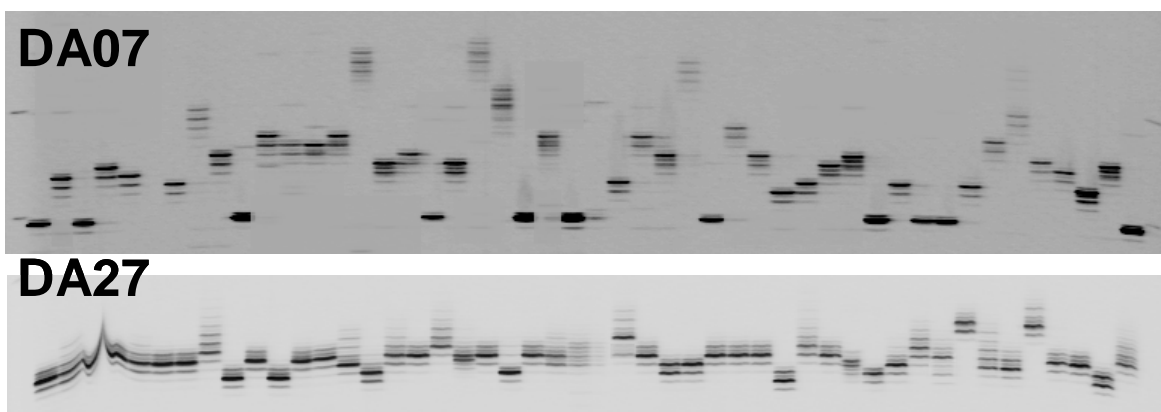


図8. 開発*D. acuminata*のMSマーカーによるPCR産物の電気泳動像
(図中に各マーカーの名前を示す)

表4. *Dinophysis acuminata*の3個のMSマーカーを用いた解析結果
(広島湾から分離したクローン培養株を用いた)

マーカー	分析個体数	PCR成功率	対立遺伝子数	遺伝子多様度
DA07	46	97.9	14	0.87
DA25	37	78.7	12	0.85
DA27	47	100	7	0.66
平均	43.3	92.2	11	0.79
標準偏差	5.5	11.7	3.6	0.11

加えて、下痢性貝毒原因種の代表種として世界的に広く知られている*D. fortii*についても、現時点で世界初と思われるが、ごく最近になりその培養に成功した (Nagai et al. in press, 図9、A-H)。現在では、両種ともに>1,000細胞/mLの密度で培養可能であり、これら両種の培養成功により、本課題の遂行が可能となった。*D. fortii*のMSマーカーの開発については、448個のシーケンズ配列を読み、66個のプライマーを設計し、PCR増幅が認められた5個のマーカーについて、現在、さらにPCRの条件などを検討中である。なお、広島湾、鳥取市沿岸、

熊本県八代海から合計100株以上を単離・培養し、既に集藻済みである。今後、MSマーカーの開発およびタイピング技術の開発を急ピッチで進めたい。

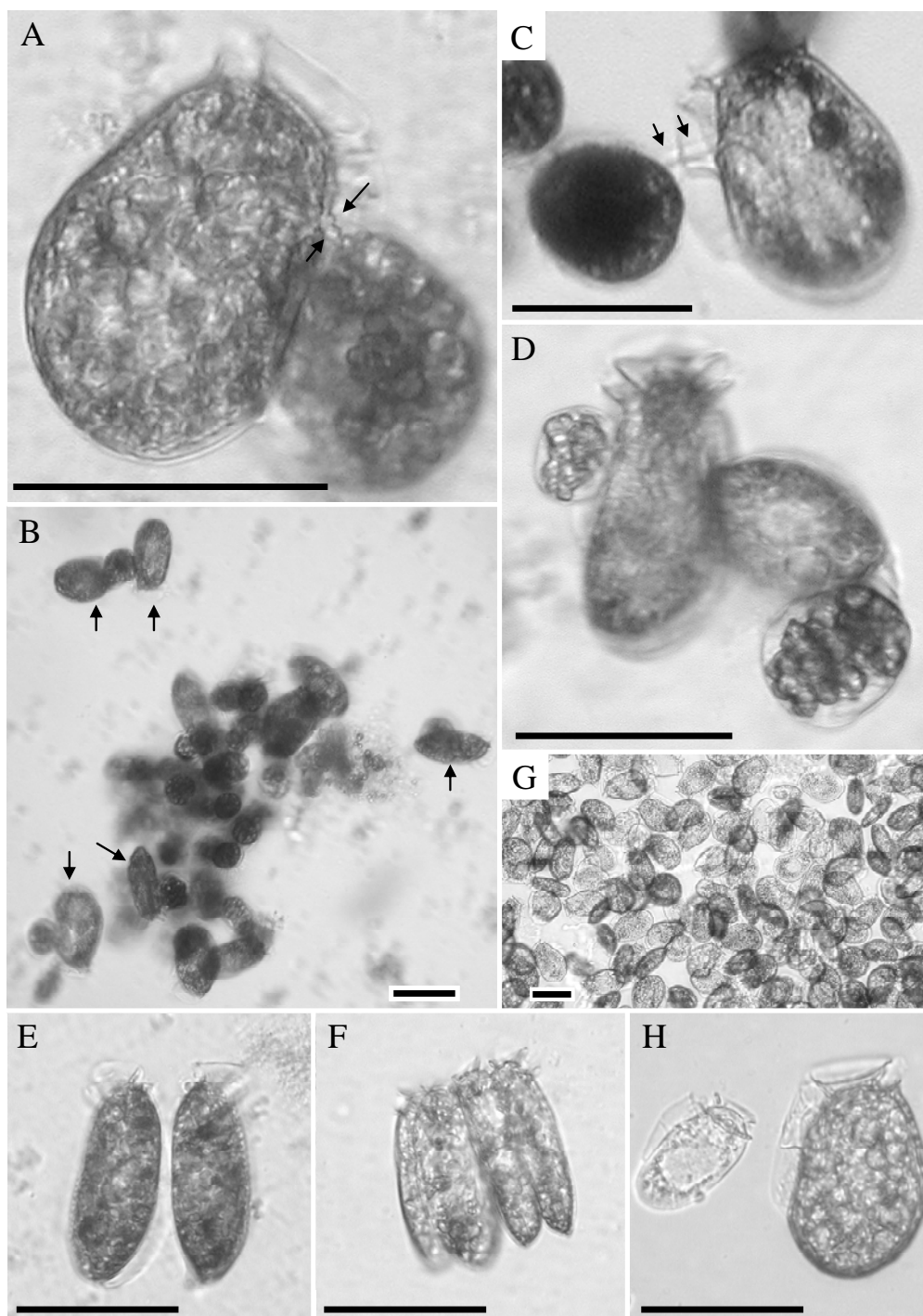


図9. *Dinophysis fortii*の室内培養の成功例

A, Feeding tube (peduncle)の先端を餌である繊毛虫*Myrionecta rubra*に突き刺し、細胞内容物を吸い上げている様子。矢印は、透明なpeduncle中を移動する繊毛虫の細胞内容物を示す；B, 積極的に餌生物を捕獲する様子。矢印は繊毛虫の捕獲に成功した*D. fortii*細胞；C, peduncleを繊毛虫に突き刺した直後を示す；D, 繊毛虫を捕獲して補食しながら遊泳する*D. fortii*細胞；E, 分裂直前の細胞；F, 4細胞が連なった*D. fortii*を示す。この後、4細胞は離れ、正常に増殖した；G, 集藻した様子を示す；H, 小型細胞の出現。培養条件の悪化、餌不足の時などに発生し、接合による有性生殖を起こす。図中のバーは50 μm を示す。

3) *G. catenatum*は、麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻であり、体長は45-65 μm である（図10）。主に日本、韓国、メキシコ、スペイン、ポルトガル、オーストラリアなどの温帯～亜熱帯にかけての広い範囲に分布している。国内での最初の毒化事例は1986年山口県仙崎湾から報告されている。*G. catenatum*のMSマーカーについては、Compound SSR primer法⁷⁻⁹⁾で単離を行った。413個のシーケンス配列を読み、42個のプライマーを設計し、良好なPCR増幅が認められた13個のマーカーについて、大分県猪串湾から分離した27株のクローン培養株からそれぞれ抽出したDNAサンプルを用いて、多型性を調べた結果、多型性を示す2個のMSマーカーの開発に成功した（図11）。猪串湾と山口県仙崎湾（n=13）の個体群において、Fisher's exact testを行った結果、MSマーカーGC01の方では有意な遺伝的分化を示すことが判明した。従って、本種においても、個体群分子タイピング技術は有効と思われる。本種は、世界のほぼ全ての温帯・亜熱帯沿岸域に分布しており、今後、より多くのMSマーカーを開発し、より多くの個体群の解析を進めたい。

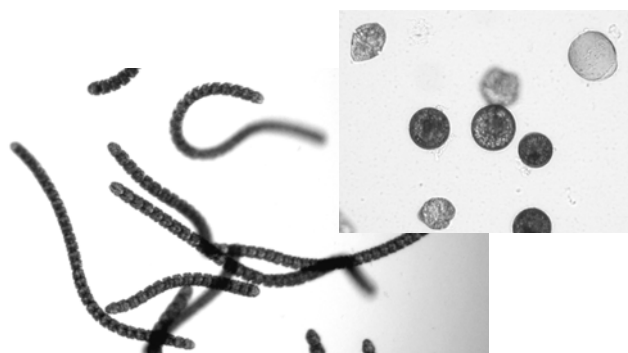


図10. *G. catenatum*の栄養細胞（左）と耐久性シスト（右）

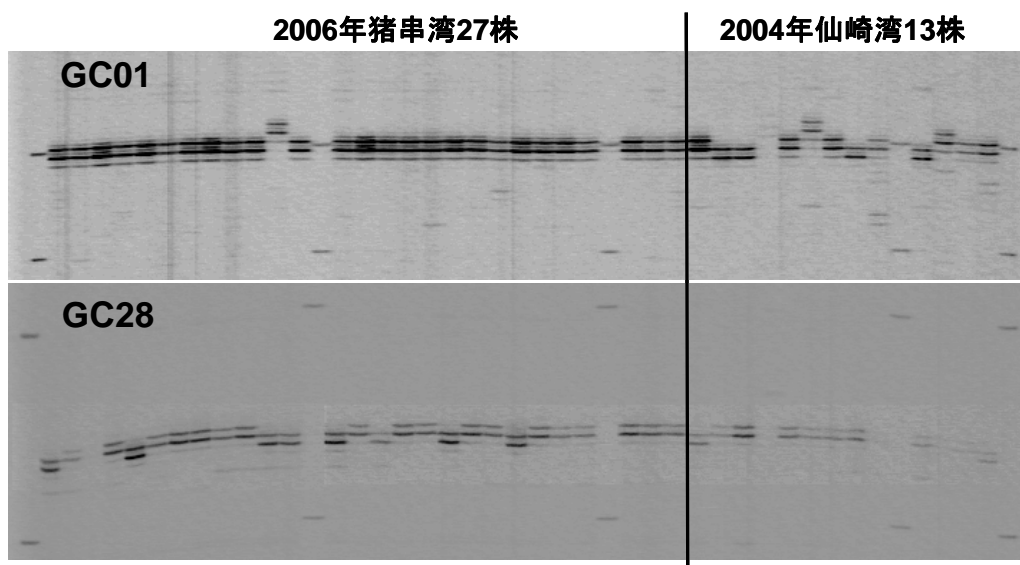


図11. *Gymnodinium catenatum*の2個のMSマーカーを用いた解析結果（猪串湾および山口県仙崎湾分離したクローン培養株を用いた）

4) *H. circularisquama*は、*Heterocapsa*属の1種で、体長20-29 μm の渦鞭毛藻である(図12)。1988年に高知県浦ノ内湾で日本で初めて赤潮を形成し、二枚貝を大量に殺すという被害を出した。以降、わずか20年の間に、西日本のほぼ全域に分布を拡大し、アサリ、マガキ、真珠貝、ムール貝、アワビ等に総額200億円以上の被害を与えてきた。何故、二枚貝だけを殺すのかその原因については不明だが、本種の大きな特徴である。*H. circularisquama*のMSマーカーをSSR primer法³⁻⁶⁾により単離した。MSマーカーの開発は、1988年に高知県浦ノ内湾から日本(世界)で最初に分離された*H. circularisquama*のDNAを用いて実施した。396個のシーケンス配列を読み、63個のプライマーを設計し、PCR増幅を試みたところ、28個でPCR増幅が確認できた。このうち、15個の多型を有するMSマーカーを得た。アレル数は2-6 (3.4 ± 1.1 、平均土標準偏差, $n=45$)の範囲、遺伝子多様度は0.205-0.684 (0.498 ± 0.146)の範囲にあった(表5)。マーカー間で有意なリンケージは検出されず、以上から、本種の分子タイピングに使用可能な15個のマーカー開発に成功した(図13、図14)。2006年英虞湾、2007年浜名湖および長崎県天草市楠浦湾からそれぞれ45、40、40株のクローン培養株(合計125株)を単離・培養し、14個のマイクロサテライトマーカーを用いて、多型解析を実施した。

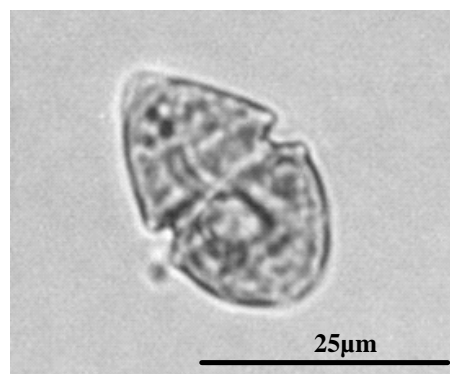


図12. *H. circularisquama*の遊泳細胞

表5. 有害渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama*における15個のMSマーカーの開発と各マーカーの特徴(45個のクローン培養株を用いて解析)

Locus	Repeat motif	Primer sequence	T_a ($^{\circ}\text{C}$)	No. of non-amplifying samples	No. of alleles	Size range (bp)	Gene diversity	Genbank accession number
HC05	(GT) ₁₄	F: TAMRA-CAACCATCAAGTTAGTGCTATGC R: TCACTTGCAATGTCAGGTCACAGGA	57	0	2	244-245	0.458	AB287380
HC06	(CT) ₁₃	F: CCAACCCCTTTCACGTGTTTTCTCC R: TAMRA-AACGGGAAAAGCAAACCTGATGTTCC	57	0	5	266-284	0.669	AB287381
HC07	(GT) ₁₂	F: TTTACTGCCAGTTTCCTGCAATGCAAC R: TAMRA-TGTTTGTATGCAAACCTTGTGGCTTCC	57	2	2	250-254	0.498	AB287382
HC14	(GT) ₁₅	F: TTGAGACTTTGAGGTCAAACCTTGC R: TAMRA-TCGAGCACGTAGTACTTCGAGTCCA	57	0	4	168-176	0.609	AB287383
HC15	(GT) ₂ GC(GT) ₁₁ G ₀	F: ATGTGGCAGCAAACCGAAGCATGCA R: TAMRA-TGTTTCTGCATATCTTCCCCTTGG	57	0	2	232-237	0.480	AB287384
HC16	(CT) ₁₀	F: TAMRA-TTCACCCGGTTCATGATACCG R: TTTGGACTTTGCAGCAGAACAGCAGAG	57	0	3	197-205	0.304	AB287385
HC18	C ₁₁ N ₇ (CA) ₃ CG(CT) ₁₁	F: AAGAGCATTGGTATTCTGCACCATAGC R: TAMRA-AACGAGAGAGGGGTACATGTTACAC	60	0	6	256-278	0.684	AB287386
HC21	(CT) ₁₁	F: GTTTTTCTGAATGATCGGCCTTTGTC R: TAMRA-CGTGCACGTATACATAAGGGCG	57	0	3	181-189	0.529	AB287387
HC58	(GT) ₈	F: ACAAGCCTCGAGGAGCATATGG R: TAMRA-GTCGTCACAATACCGCATCCT	57	0	3	225-229	0.486	AB287388
HC61	(CT) ₁₅	F: CGTGATTGATGTGAAGAGC R: TAMRA-CATTCCTGCTGTGTTGGTGAGT	57	1	3	185-197	0.305	AB287389
HC62	(CT) ₉ GT(CT) ₄	F: TAMRA-TATGTAGATGCGTGCCTCTCTCC R: ACCCAGTACATACATATGCCAAGC	57	0	4	258-270	0.645	AB287390
HC63	(CT) ₁₅ GT(CT) ₅ T(GC) ₃	F: CGGGTGTGATCAGATTTAAAACAAGCC R: TAMRA-TACCTCTGCACGCAGCATGACT	57	0	4	137-147	0.205	AB287391
HC65	(CT) ₁₁	F: CCATTCCAATTTCAATCATCAACACC R: TAMRA-CATGTATCGGTATATGCATATGATGG	53	0	4	230-242	0.388	AB287392
HC73	(CT) ₁₃	F: CTTTCCCTATCCCTTTTCCCTTGC R: TAMRA-AGAAGGACATGCAGAGGCG	60	1	3	247-266	0.629	AB287393
HC75	(CT) ₁₂	F: TAMRA-CCTCAGGATTCATGTGGC R: GCATTTCTCAAGTGGGCATCTC	60	0	3	186-198	0.577	AB287394

Ta, 各プライマーのアニーリング温度; Gene diversity, 遺伝子多様度(Nei 1987)

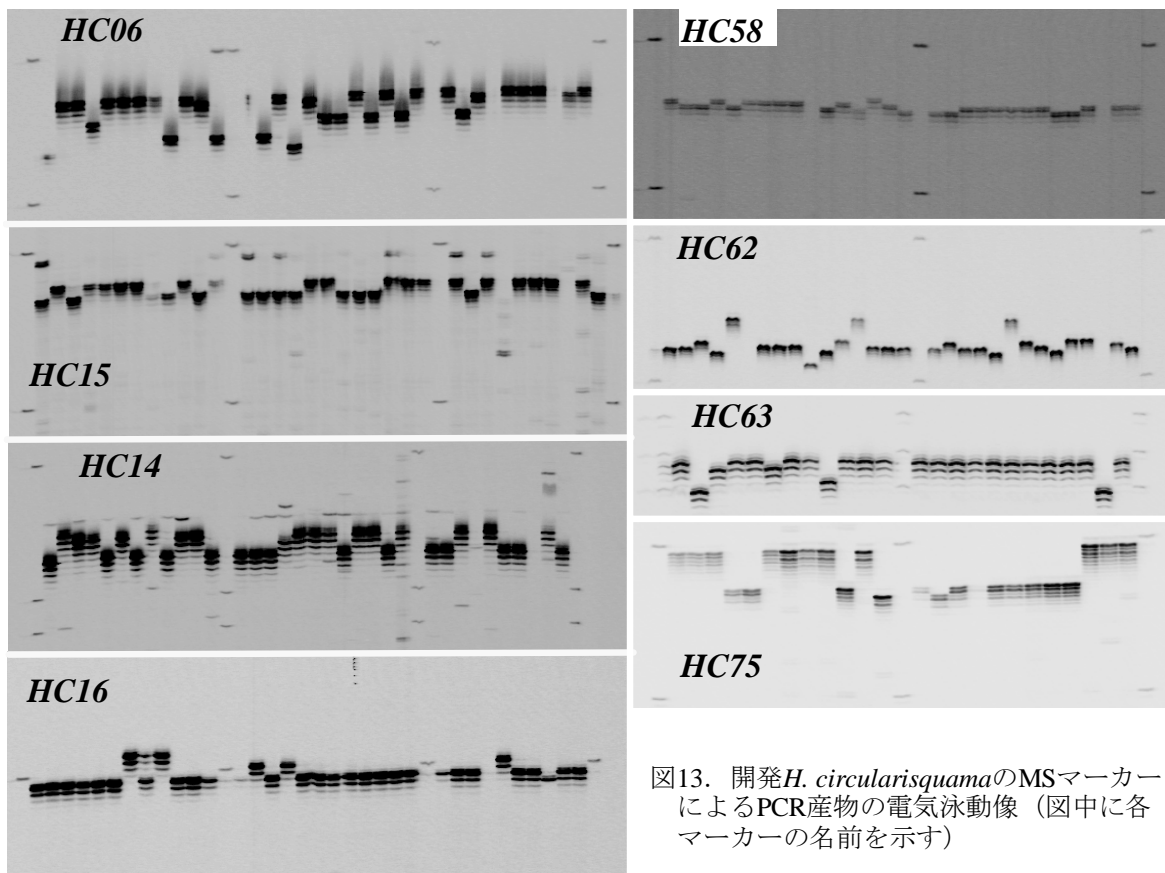


図13. 開発*H. circularisquama*のMSマーカーによるPCR産物の電気泳動像 (図中に各マーカーの名前を示す)

	HG05	HG06	HC07	HC14	HC15	HC16	HC18	HC21	HC58	HC61	HC62	HC63	HC65	HC73	HC75
1	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	D	C	B	C
2	A	E	A	D	B	A	E	B	B	B	B	A	C	B	C
3	A	E	A	C	A	A	E	B	B	B	B	C	C	A	B
4	B	C	B	C	B	A	A	B	A	C	C	D	C	C	B
5	A	E	B	A	B	A	A	B	B	B	B	C	C	B	B
6	A	E	A	C	B	A	C	A	B	B	B	C	C	B	C
7	A	E	B	A	C	A	A	A	A	B	B	D	C	A	C
8	B	E	A	D	A	A	A	A	B	B	B	D	C	C	C
9	B	E	B	A	A	C	A	A	B	B	B	D	C	A	C
10	B	D	B	C	B	A	D	A	B	B	B	D	C	A	B
11	A	D	A	A	A	A	E	A	B	B	B	D	C	B	C
12	A	B	A	A	B	A	C	B	B	A	C	D	C	A	B
13	A	E	B	A	A	A	C	B	B	C	C	D	C	C	A
14	A	B	B	A	A	B	A	A	C	A	B	D	C	C	B
15	A	A	B	A	A	A	C	A	C	C	C	D	C	A	B
16	B	A	B	B	A	B	E	C	B	B	C	D	C	B	B
17	A	D	A	C	B	A	C	A	B	C	C	D	A	B	B
18	A	C	B	C	B	A	B	A	B	C	A	D	C	B	B
19	A	C	A	C	A	A	C	B	B	C	B	D	C	A	B
20	B	E	B	A	A	A	A	A	A	C	B	D	C	C	B
21	A	E	A	C	A	A	A	A	B	A	B	D	D	B	B
22	A	C	A	C	B	A	A	A	C	B	B	D	C	A	B
23	A	E	A	A	B	A	E	A	B	B	C	A	C	A	B
24	B	C	A	C	B	A	A	B	B	B	B	D	C	B	B
25	A	C	A	A	B	A	F	B	B	A	C	D	C	A	B
26	B	E	B	A	A	A	C	B	B	B	B	D	C	B	B
27	B	D	B	A	B	A	E	A	B	B	D	D	C	C	B
28	B	E	A	C	B	A	C	A	B	B	B	D	C	B	B
29	B	E	A	A	B	A	A	B	B	B	B	D	C	B	B
30	B	E	B	A	B	A	A	A	B	B	B	D	A	B	B
31	B	B	A	D	B	A	E	A	B	B	C	D	C	A	C
32	A	B	A	A	B	A	C	A	B	A	C	D	D	A	C
33	A	D	B	A	B	A	A	A	B	A	C	D	D	A	C
34	A	E	B	C	A	A	A	B	B	C	B	D	D	A	C
35	A	C	.	D	A	B	A	B	A	A	B	D	D	A	C
36	B	E	B	D	B	A	C	B	B	A	C	D	D	A	C
37	A	B	B	D	B	A	C	B	B	C	B	D	D	C	B
38	A	C	B	A	B	A	B	A	B	B	B	D	D	B	B
39	A	E	B	A	B	A	C	A	B	B	C	D	D	C	B
40	A	E	A	A	B	A	C	A	B	B	A	D	D	C	B
41	A	A	B	C	A	B	A	B	B	A	C	D	D	C	B
42	A	C	B	C	B	A	E	A	B	B	B	D	D	B	A
43	A	E	.	A	B	A	A	A	A	C	C	D	D	A	B
44	B	E	A	C	B	A	A	A	A	A	A	D	D	C	A
45	B	E	A	A	A	A	A	B	B	C	C	D	C	A	B

図14. 開発した15個のMSマーカーによる各個体の分子タイピング (英虞湾全45サンプル) 図中のピリオドは欠失サンプルを示す。45個体は全て異なる遺伝子型を示した。

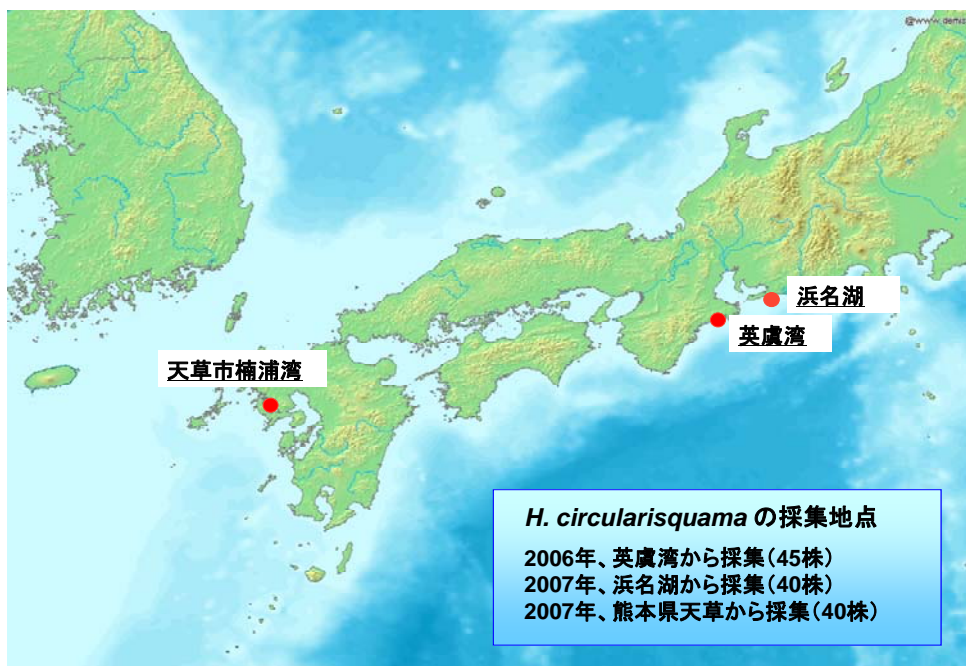


図15. *H. circularisquama*のサンプリング地点

遺伝子座	個体群			
HC05	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	244	62.2	57.5	75.0
	245	37.8	42.5	25.0
HC06	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	266	6.7	2.5	
	270	13.3	17.5	62.5
	276	20.0	20.0	32.5
	280		5.0	2.5
	282	8.9	20.0	2.5
	284	51.1	35.0	
HC14	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	168	46.7	20.0	27.5
	172	2.2		2.5
	174	40.0	77.5	70.0
	176	11.1	2.5	
HC15	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	232	40.0	60.0	42.5
	237	60.0	37.5	57.5
	239		2.5	
HC16	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	197	82.2	77.5	62.5
	201	13.3	10.0	37.5
	205	4.4	12.5	
HC18	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	242	71.1	62.5	92.5
	244		12.5	
	246	28.9	25.0	7.5
HC21	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	181	40.0	47.5	80.0
	185	55.6	52.5	20.0
	189	4.4		
HC58	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	225	35.6	62.5	50.0
	227	62.2	37.5	50.0
	229	2.2		
HC61	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	185	15.9	35.0	35.0
	187		20.0	
	195	2.3	5.0	2.5
	197	81.8	40.0	60.0
	199		2.5	
HC62	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	258	20.0	15.0	12.5
	260	51.1	67.5	87.5
	262	22.2	15.0	
	270	6.7	2.5	
HC63	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	137	4.4		
	139		2.5	
	141	2.2	5.0	17.5
	145	4.4	10.0	2.5
	147	88.9	82.5	80.0
HC65	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	226		2.5	
	230	20.0	10.0	7.5
	232		2.5	
	234	2.2		
	240	75.6	82.5	92.5
	242	2.2	2.5	
HC73	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	247	31.8	35.0	45.0
	254		42.5	
	256	47.7	5.0	55.0
	266	20.5	15.0	
	272		2.5	
HC75	英虞湾	浜名湖	楠浦湾	
	186	13.3	12.5	2.5
	188	55.6	62.5	97.5
	198	31.1	25.0	

図16. 14個のMSマーカーを用いた*H. circularisquama*3個体群の対立遺伝子出現頻度。各マーカーごとに、左カラムは対立遺伝子を示し、個体群毎に出現頻度を示した。

アレル数は2-6 (3.9 ± 1.1) の範囲、遺伝子多様度は0.28-0.75 (0.49 ± 0.1) の範囲にあった。対立遺伝子の出現頻度を比較すると (図16)、3海域共通の対立遺伝子は31個、2海域共通の対立遺伝子の内、英虞湾と浜名湖、英虞湾と楠浦湾、楠浦湾と浜名湖でそれぞれ共有が見られたのは、9、1、1個であった (表6)。また、英虞湾、浜名湖、天草のみで検出された対立遺伝子は、それぞれ4、8、1個であった。さらに、UPGMA法によるデンドログラムは、英虞湾、浜名湖の個体群は近縁であることを示した (図17)。英虞湾および三河湾の個体群は、楠浦湾の個体群のみが有する1個の対立遺伝子を除いた33個の対立遺伝子を全て保有していることから、英虞湾や浜名湖の個体群の一部の個体が、何らかの人為的理由で楠浦湾に運ばれ、増殖した可能性が高いことを示唆する。本城ほかは、西日本において、マガキや真珠貝の養殖において、より良好な成長を求めて、母貝・稚貝生産地からの移植が盛んに行われてきた結果、*H. circularisquama*の個体群が貝類の移植とともに運ばれ、西日本沿岸各地に急速に分布を広げたことを指摘した¹⁶⁾。興味深いことに、Fisher's exact testの結果、いずれのペア個体群間においても、有意な集団分化が検出され、本種が日本で初めて確認されて以来、わずか20年しか経過していないにもかかわらず、既に集団構造に有意な差が見られることが示された (表7)。も本結果は、個体群のサイズが小さいために生じるボトルネック効果のようなものであり、おそらく、最初は、ごく小規模の個体群が日本に入ってきて、その後、新しい対立遺伝子が生じながら、西日本沿岸各地で分布を広げたことを示唆すると思われる。本種は、1988年の赤潮発生以来、西日本において急速に分布を拡大させた。分布の拡大メカニズムを究明すべく、今後、さらに多くの海域に出現する個体群をサンプリングし、解析を行いたい。

表6. 3個体群間の対立遺伝子の共有性
図16から3海域共通、2海域共通、1海域のみ保有する対立遺伝子を集計。

3海域共通	31
英虞湾・浜名湖	9
英虞湾・楠浦湾	1
楠浦湾・浜名湖	1
2海域共通(合計)	11
英虞湾のみ	4
浜名湖のみ	8
楠浦湾のみ	1
1個体群のみ	13

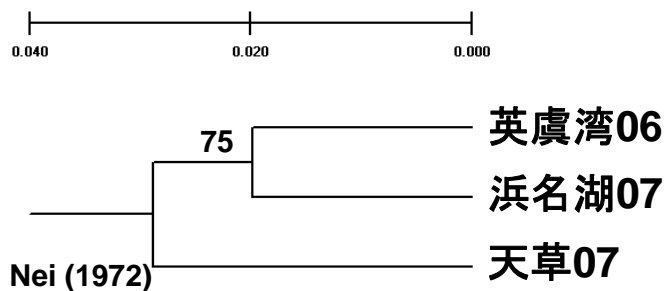


図17. UPGMA法によるデンドログラム¹³⁾。
図中の数字はブートストラップ値を示す。
>50%の値のみを示した。

表7. *H. circularisquama* 3個体群のFisher's exact testの結果。
表中の数字はP値を示す

	英虞湾2006	浜名湖2007	楠浦湾2007
英虞湾2006			
浜名湖2007	$P < 0.00001^*$		
楠浦湾2007	$P < 0.00001^*$	$P < 0.00001^*$	

*, $P < 0.001$ after Bonferroni correction

5) *P. bahamense*は、体長30-53 μm の麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻であり、東南アジアおよび中南米の熱帯域を中心に分布している。インドネシア・フィリピンでは2001年までに117名の死者と2,000名以上の中毒患者を出しており、大きな社会問題となっている。今後、地球温暖化に伴う水温上昇により、今後国内でも本種が発生する可能性がある。現在、*P. bahamense*のマーカについては、開発途中である。現時点で、フィリピンマニラ湾から分離した4株しかクローン培養株を保持しておらず、マーカの開発は可能であるが、タイピング技術を確立することができない状況にある。1、2の海域から分離した株が40株程度ないと、MSマーカの特徴把握および分子タイピング技術の確立ができない。現在、フィリピンの研究協力者にサンプリングの依頼をしており、今後、サンプルの入手と培養株の確立を急ぐ予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

高度多型分子マーカを用いた個体群の集団遺伝学的解析は、ほ乳類・高等植物等で盛んに行われてきているが、有害・有毒微細藻類に適用した例はほとんどなく新規性がある。既に、本申請者は、日本沿岸域において*A. tamarense*個体群の海流による海域間混合が一部の海域を除いてほとんど見られないことを報告している¹⁷⁾。沿岸域の海水交換があまりなく、他種においても海域間の海流による自然輸送がほとんどないと予測されることから、遠距離に分布する個体群間に遺伝的類似性が見られる場合、人為的な要因による海域間輸送と特定できることに、本研究の新規性・独創性がある。これまで他の研究予算も含めて3種類について日本および韓国沿岸域に分布する個体群について、MSマーカによる個体群構造の解析をしてきたが、その成果として個体群構造が種によって大きく異なること、また、対象種の海流による輸送、人為的な要因による輸送等が検出されており、本課題についても、今後の科学的に極めて重要な研究成果となる可能性が高い。また、研究対象とする種は、いずれも世界汎種であることから、今後、国際共同研究への進展が期待できる。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究で得られた成果は、関連学会や国際誌への投稿、日本国内外での関連学会での成果発表、課題担当者の所属する水産総合研究センター本部の広報誌であるFRAニュースや瀬戸内海区水産研究所の広報誌である瀬戸内通信に掲載し、成果の広報や普及に努めたい。

6. 引用文献

- (1) Nagai S, Matsuyama Y, Oh SJ and Itakura S (2004). Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima, Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol.* 51: 103-109.
- (2) Lian LC, Miwa M and Hogetsu, T (2001). Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88-98.
- (3) Nagai S, Lian CL, Hamaguchi M, Matsuyama Y, Itakura S and Hogetsu T (2004). Development of microsatellite marker in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*

- (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes* 4: 83-85.
- (4) Nagai S, Yamaguchi S, Matsuyama Y and Itakura S (2006). Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing algae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes* 6: 477-479.
- (5) Nagai S, McCauley L, Yasuda N, Erdner DL, Kulis DM, Matsuyama Y, Itakura S and Anderson DM (2006). Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes* 6: 756-758.
- (6) Nagai S, Sekino M, Matsuyama Y and Itakura S (2006). Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes* 6: 120-122.
- (7) Lian CL, Wadud MA, Geng QF, Shimatani K and Hogetsu T (2006). An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. *J Plant Res* 119: 415-417.
- (8) Nishitani G, Nagai S, Masseret E, Lian CL, Yamaguchi S, Yasuda N, Itakura S, Grzebyk D, Berrebi P and Sekino M. Development of compound microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Plankton & Benthos Research*, in press.
- (9) Nishitani G, Nagai N, Sakamoto S, Lian CL, Nishikawa T, Lee CK, Uji R, Itakura S and Yamaguchi M. Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing algae *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae), *Molecular Ecology Notes*, in press.
- (10) Raymond M. and Rousset F (1995). GENEPop version 3: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- (11) Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Ye ZH and Mao JX (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center*, University of Alberta, Canada.
- (12) Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- (13) Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.
- (14) Hiroishi S, Okada H, Imai I and Yoshida T (2005). High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful algae* 4: 783-787.
- (15) Park MG, Kim S, Kim HS, Myung G, Kang YG and Yih W (2006). First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Microb. Ecol.* 45: 101-106.
- (16) Honjo T., Imada, N., Oshima, Y., Maema, Y., Nagai, K., Matsuyama, Y. & Uchida, T. (1998). Potential transfer of *Heterocapsa circularisquama* with pearl oyster consignments. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. & Wyatt, T. [Eds.] *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and International Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 224- 6.
- (17) Nagai S, Lian CL, Yamaguchi S, Hamaguchi M, Matsuyama Y, Itakura S, Shimada H, Kaga

S, Yamauchi H, Sonda Y, Nishikawa T, Kim CH and Hogetsu T (2007). Microsatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Japanese coastal waters. *Journal of Phycology* 43: 43-54.

7. 国際共同研究等の状況

- (1) French EC2C0 project (ÉCOSPHÈRE CONTINENTALE et CÔTIÈRE)、Biodiversity and genetic structure of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* populations in Thau lagoon (French Mediterranean Sea)、Dr. Yves Collos・Montpellier University・France、課題担当者は分担研究者として参加し、サンプルを互いに送付し分析などを実施、フランス政府の予算で日本（課題担当者）との国際共同研究予算（平成18～19年）
- (2) 科学技術振興調整費・アジア科学技術協力の戦略的推進、東シナ海有害赤潮の日中韓国際連携研究、松岡数充（研究代表者）、日本（長崎大学・東京大学・瀬戸内海区水産研究所）・韓国（韓国水産科学院）・中国（中国科学院）、東シナ海の海洋環境悪化に伴い頻発する有害赤潮の被害防止に向けた日中韓の国際共同研究（平成18～20年）
- (3) 平成17年度水産総合研究センター国際共同研究、有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium minutum* 及び *A. ostenfeldii* の多型分子マーカーの開発と個体群構造の解明、Prof. Donald M. Anderson・Woods Hole Oceanographic Institute・USA、課題担当者とウッズホール海洋研究所との国際共同研究、世界沿岸各地に分布する麻痺性貝毒種について、全地球規模スケールで個体群構造を解明するための研究（平成17年度終了）
- (4) 平成20年度水産総合研究センター国際共同研究、新奇有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium ostenfeldii* のモニタリングの高度化：LAMP法プライマーおよび高度多型分子マーカーによる個体群構造の解明、Prof. Donald M. Anderson・Woods Hole Oceanographic Institute・USA、Dr. Anke Kremp・Helsinki University、課題担当者とウッズホール海洋研究所およびHelsinki大学との国際共同研究、Baltic海および太平洋沿岸に分布する麻痺性貝毒種について、全地球規模スケールで個体群構造を解明するための国際共同研究（平成20年度のみ）
- (5) その他（現在、予算申請中の国際共同研究）イギリス（Prof. David G. Mann, Dr Katharine Evans・Royal Botanic Garden Edinburgh, England）・中国（Dr. Jinhui Wang・East China Sea Environmental Monitoring center, China）・韓国（Prof. Myung-Soo Han・Hanyang University, Korea）と有害・有毒プランクトンの個体群構造の解明に関する国際共同研究を実施中である。現在、Montpellier University (France) から、日本学術振興会海外特別研究員制度を利用して、Dr. Benjamin Genovesiと共同研究（H20年度）、また、韓国政府からKRF予算を獲得し、韓国漢陽大学からMiss. Soo-Yeon Choを受入れ（H20年度）、共同研究を進めている。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Nagai S, Nishitani G, Tomaru Y, Yamaguchi S, Kamiyama T. Predation on the ciliate *Myrionecta rubra* by the toxic dinoflagellate *Dinophysis fortii* and observation of

sequestration of ciliate chloroplasts. *Journal of Phycology*, 44: 909-920.

- 2) Nishitani G, Nagai S, Yamaguchi S, Kamiyama T. Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis caudata* (Dinophyceae) (2008). *Plankton & Benthos Research*, 3: 78-85.
- 3) Nishitani G, Nagai S, Takano Y, Sakiyama S, Baba K. and T. Kamiyama. Growth characteristics and phylogenetic analysis of marine dinoflagellate *Dinophysis infundibulus* (Dinophyceae). *Aquatic Microbial Ecology* (in press).
- 4) Nagai S, S. Yamaguchi, CL. Lian, G. Nishitani, S. Itakura and M. Yamaguchi_(2007). Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing algae *Heterocapsa circularisquama*, *Molecular Ecology Notes*, 7: 993-995.
- 5) Nishitani G, S. Nagai, CL. Lian, H. Yamaguchi, S. Sakamoto, S. Yoshimatsu, K. Oyama, S. Itakura and M. Yamaguchi (2007). Development of compound microsatellite markers in the harmful red tide species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 7: 1251-1253.

<その他の誌上発表（査読なし）>

なし

（2）口頭発表（学会）

- 1) 長井 敏・西谷 豪・山口早苗・神山孝史. 下痢性貝毒原因渦鞭毛藻*Dinophysis*属における繊毛虫*Myrionecta rubra*からの葉緑体の選択的取り込み培養と観察. 2008年日本藻類学会大会第31回大会, 80p.
- 2) 長井 敏・西谷 豪・山口早苗・神山孝史. 下痢性貝毒原因渦鞭毛藻*Dinophysis*属における繊毛虫*Myrionecta rubra*からの葉緑体の選択的取り込み培養と観察. 2008年度日日本水産学会春季大会, 214p.
- 3) 山口早苗・長井 敏・練 春蘭・西谷 豪・山口峰生・板倉 茂. 有害渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama*のマイクロサテライトマーカーの開発とその特徴. 2008年度日日本水産学会春季大会, 214p.
- 4) 長井 敏. マイクロサテライトDNAマーカーによる赤潮プランクトンの集団遺伝解析の現状と問題点. 2007年第1回海洋生物育種工学研究会. 講演要旨集, 14P.
- 5) 西谷豪・長井 敏・山口早苗・神山孝史. 有毒渦鞭毛藻*Dinophysis caudata*の培養2007年度日本水産学会秋季大会, 144p.
- 6) 西谷豪・長井 敏・高野義人・山口早苗・神山孝史. 有毒渦鞭毛藻*Dinophysis infundibulus*の培養と系統解析2007年度日本水産学会秋季大会, 144p.
- 7) 長井 敏・西谷 豪・外丸祐司・山口早苗・神山孝史. 下痢性貝毒原因渦鞭毛藻*Dinophysis fortii*の培養と観察. 2007年度日本水産学会秋季大会, 144p.
- 8) 長井 敏・松浦玲子・西谷 豪・山口早苗・神山孝史. 小型クリプト藻*Teleaulax amphioxieia*の単離・培養と分子同定. 2007年度日本水産学会秋季大会, 144p.
- 9) Nagai S, Nishitani G, Yamaguchi S, Lian CL, Yasuda N and Itakura S: ASLO 2007 Aquatic scientific meetings (2006) 「Genetic structure and gene flow of populations in several harmful algal bloom species in Japanese coastal waters revealed by microsatellites」

- 10) Nagai S, Nishitani G, Yamaguchi S, Lian CL, Yasuda N, Matsuyama Y and Itakura S: 5th Marine Bio invasion International Conference (2007) 「Transfer of harmful algal bloom species in Japanese and Korean coastal waters through natural and human associated dispersals revealed by microsatellites」
- 11) 山口早苗・長井 敏・練 春蘭・西谷 豪・板倉 茂・山口峰生：平成18年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会（2006）「有害渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama*のマイクロサテライトマーカーの開発とその特徴」

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし