

課題名	R F - 0 6 6 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		
課題代表者名	長井 敏（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）		
研究期間	平成18-19年度	合計予算額	19,304千円（うち19年度 9,307千円） ※上記の合計金額には、間接経費4,454千円を 含む
研究体制	<p>研究体制</p> <p>(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（独立行政法人瀬戸内海区水産研究所）</p> <p>(2) 人間活動による有毒微細藻類の海域間移動の直接的な検証（独立行政法人瀬戸内海区水産研究所）</p>		
研究概要	<p>研究概要</p> <p>1. はじめに（研究背景等）</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>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 <i>Chattonella ovata</i>、<i>Dinophysis fortii</i>、<i>Dinophysis acuminata</i>、<i>Gymnodinium catenatum</i>、<i>Heterocapsa circularisquama</i>、<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> 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。地方個体群を識別・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。個体群の海域間移動の有無、その要因を解明するためのシステムを確立する。</p> <p>人の健康や海洋生態系の攪乱に大きな影響を及ぼす有毒微細藻の拡大について、実際の経済活動で海域間の輸送の実態については、船舶のバラスト水による移送を除いて実態がほとんど把握され</p>		

ていない。バラスト水に関しては、国際海事機関（IMO）が「船舶バラスト水及び沈殿物の管制及び管理のための国際条約」を示して国際的な枠組みで管理に乗り出している。バラスト水による移送が期間やルートが限定的であるのに対し、水産種苗の移植や養殖魚介類の産地間輸送さらには木材や海砂の運搬等を介した有毒微細藻類の人為的移送は、海域から海域へ直接的、かつ短時間で輸送が行われ、その頻度も非常に高く、人為的輸送の主要なルートと考えられるものの、過去にこれら経済活動による海域間輸送についてはほとんど実態が把握されていない。そこで、バラスト水、水産種苗の移植、木材や海砂の運搬等を介した有毒微細藻類の移送のモニタリングを迅速簡便かつ正確にできるよう、検出・定量技術を確認しマニュアル化を行う。実際に、輸送中の水産種苗などから有毒微細藻類の検出・定量を行い、有毒微細藻類の人為的な要因による海域間移送の実情について解析を行う。

3. 研究の方法と結果

(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

培養株の確立の確立については、標記6種については、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）。各種、個体群を識別・分子タイピングする手法を確立するため、高度多型分子マーカーとして知られるMSマーカーの開発を行い、成功した種については、MSマーカーの性能評価と、2、3の海域から得られた個体群の分子タイピングを行い、地方個体群を識別できるかどうか検証した。

1) *C. ovata*: *C. ovata*の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（ $n=21$ ）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±標準偏差）の範囲にあり、個体群分子タイピングが可能な多型分子マーカーの開発に成功した（図1）。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。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、アレル数は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。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。

No.	genotype
1.	BCABDHGGAACEFCCEFADBBCC
2.	EE. . GGGGAAAAEECCCAEBCCC
3.	ABBBACDDAAAAEECCCAEBCCC
4.	BCACGGAAABADG ADIBCABBCC
5.	BBBCEGBGAAADEEDDBCFBCC
6.	CCBBGGHAA. . GCCE. . AEBB. .
7.	BEBBDDCJAAADEECCBGAEBBCC
8.	BCDDGGGBBAACJCCACAEBBAC
9.	ABBCGGGGAAACEGCCACFFBCCC
10.	BDBBEGDDAAADAEECCDFBABC
11.	BCCCGGHI ADAEECCCAEBBCC
12.	. . AC. . DGBBADDDBCCAEBBCC
13.	BBBEBGBGAAAD. . CDCCEBC. .
14.	BCBCGGJJABADFFCCFAEBBCD
15.	BBBBDGBHAAADBECCACDFBBB
16.	BBDDDFGKACADBECCFAEBBCD
17.	BEBBBGCFAAADEECDCCAGBDC
18.	EEBBFGEAAADEECDCCBECC. .
19.	CC. . GGCFAAADEECD. . FF. . CC
20.	EEBBGGHHABDFHCCFFAEBBCC
21.	BBBGGLLAAADEECCCAEBBCC

図1. 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

2) *D. acuminata* (*D. Fortii*): *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

に影響を及ぼす環境要因の影響などに関する情報が不足していた。*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。2006年に韓国の研究者が、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、世界で初めて培養に成功した。現在、本課題担当者（長井ら）も、本種の培養をスタートさせ、長期の継代培養に成功した（図2-A、B）。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、その培養に成功した（図3-C、D）。現在、両種ともに $>2,000$ 細胞/mLの密度で培養可能となり、本課題の遂行が可能となった。MSマーカーの開発については、

*D. acuminata*では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個のマーカのみであった。今後さらに、マーカの数を増やす必要がある。*D. fortii*については、広島、鳥取、熊本県八代海から30-40株ずつクローン株確立 (>100株)に成功し、集藻後、細胞を凍結保存した。本種のMSマーカについては、480個のシーケンスを解読し、66個のMSマーカを作成したが、ほとんどのマーカで良好なPCR増幅と、多型性が見られず、マイクロサテライトの単離効率が低かった。そのため、その後の多型性を確認するに至っていない。現在、新たな方法でMSマーカを開発している最中である。

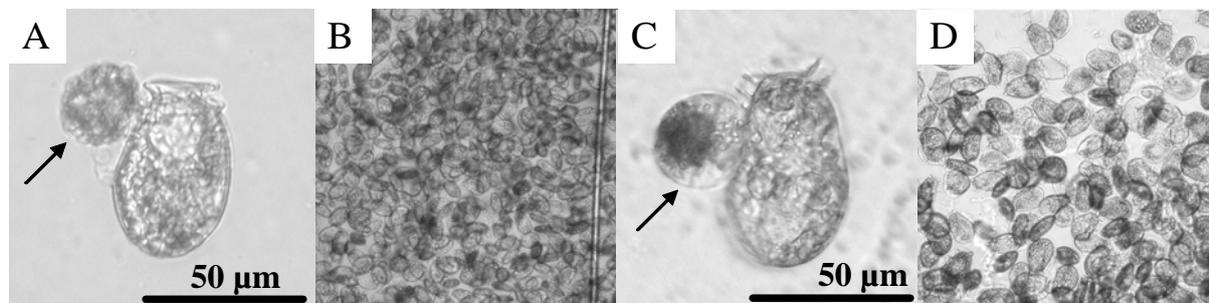


図2. *Dinophysis*属2種の培養

A, 摂食中の*D. acuminata*; B, 集藻後の*D. acuminata*細胞; C, 摂食中の*D. fortii*; D, *D. fortii*の培養の様子; 矢印は*Dinophysis*属の餌(*Myrionecta rubra*)を示す

表1. 分子タイピング技術開発の進捗状況の一覧

種類	MSマーカ開発用培養*	培養株	サンプリング海域	MSマーカ開発**	MSマーカ数**	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

3) *G. catenatum*: MSマーカの開発において、413個のシーケンス配列を読み、156個のプライマーを設計し、良好なPCR増幅が認められた13個のマーカについて、40個体のDNAサンプルを用いて、多型性を調べた結果、わずかに2個の多型を有するマイクロサテライトマーカが得られた。猪串湾27株、仙崎湾13株を用いて、多型解析を実施した結果、対立遺伝子は2-4個の範囲にあり、1個のマーカではわずかに有意な集団分化を示した。今後、さらにマーカ数を増やして解析すると有意な集団分化が検出できる可能性がある。

4) *H. circularisquama*: MSマーカの開発は、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マーカを得た。2006年英虞湾、2007年浜名湖および天草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を用いて、多型解析を実施した。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、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、英虞湾と天草、天草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。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。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。

5) *P. bahamense*: 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、マーカーの開発は可能であるが、タイピング技術を確認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マーカー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が、本研究期間内に開発に着手するのは断念した。

*、アリル（対立遺伝子）とは、MS領域の繰り返し配列の変異により生じたPCR産物の異なるバンドパターンのことを示す（図3）。

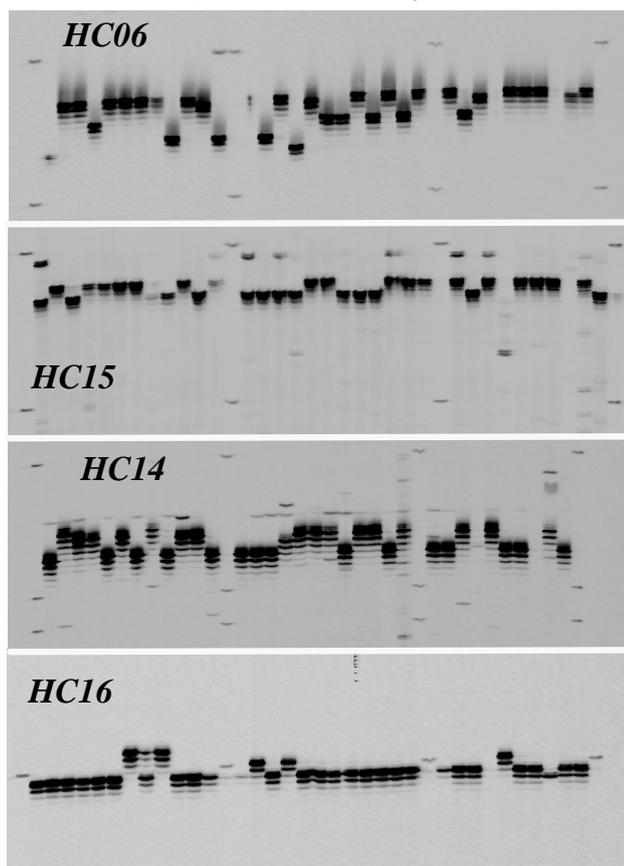


図3. 開発H. circularisquamaのMSマーカーによるPCR産物の電気泳動像（図中に各マーカーの名前を示す）

No.	genotype	No.	genotype
1.	AAAAAAABBABDCBC	26.	BCBAAACBBCADCBB
2.	AEADBAEBA. BACBC	27.	BDBCBAEAACDDCCC
3.	AEACAAEBBCBCCAC	28.	BEACBBCBBCBDCBB
4.	BCBCBAABACBDCBB	29.	BEAABAABBCBDCBB
5.	AEBABAAABCBDCCB	30.	BEBABAAABCBDABB
6.	AEACBACBBCACBBC	31.	BBADBAEBACADCAC
7.	AEBABCAABCDCAC	32.	ABAAABCABCCDACA
8.	BEADAAAAACBDC. C	33.	ADBCBAABACDDCAC
9.	BBBAACABBCBBCAC	34.	AEBAAAABCABDAAC
10.	BEBCBADABCDCAB	35.	AC. DBAABAABDACB
11.	ADBCAAEABCDCBC	36.	BEBDBBCBACCDAGB
12.	ABAABACBBCDABA	37.	ABBABACBBCBDCBA
13.	AEBAAACBBCADCCB	38.	ACBCAABABCDDDBB
14.	ABBAABAAAABDCAA	39.	AEBABACABCADCCC
15.	AEBAAAACACGDCBB	40.	AEAABACBBCDDCBB
16.	BABBABECBCADCBB	41.	AABCBAABBACDCBC
17.	ADACBACABCCDABB	42.	ACBCBAEABCBCDCBA
18.	ACBCBABBACADCBB	43.	AE. ABAAAACADACB
19.	ACACAACBBCDCAB	44.	BEACBACAAAACDCAA
20.	BEBAAAAABCBDCCB	45.	BEAAAAABCCDCAB
21.	ACACAAAABABDABB		
22.	AEACBAAAACDCAB		
23.	ACAABAEABBAACAB		
24.	BEACBAABBCBDCBB		
25.	AEAABAFBACDCAB		

図4. 開発したMSマーカーによる各個体の分子タイピング（全45サンプル）図中のピリオドは欠失サンプルを示す

（2）人間活動による有毒微細藻類の海域間移動の直接的な検証

1) マガキ種苗による有毒微細藻の移送の実態把握

2006年3月および2007年4月に北日本のA海域から西日本のB海域まで、総移動距離1,280kmを2昼夜かけてトレーラーで輸送されてきたマガキ種苗を入手して試験に用いた。種苗はホタテガイの殻にマガキ種苗が100~250個体付着した状態で、以後、1枚のホタテガイ殻を1コレクターと呼称する。このコレクターの外側と内側から出現する有毒微細藻を分けて検出を試みた。さらに、2006年5月に西日本のB海域で畜養され、隣県のC海域への出荷されるマガキ種苗も入手し、トラック輸送を想定し、滅菌海水を含ませたキムタオルでくるんで室内で一晩静置した後、上述と同様の操作を行って有毒微細藻等の出現について調査を行った。

A海域およびB海域から入手したマガキ種苗から、有毒渦鞭毛藻の一種*Alexandrium tamarense*が付着して輸送されてきたのを確認した。A海域産の種苗では貝殻外側の部分に最大42細胞、貝殻内部からの排出物には最大720細胞の*A. tamarense*の出現（遊泳細胞）を確認した。B海域産の種苗からは、貝殻外側の部分に120細胞、貝殻内部からの排出物には1,488細胞の*A. tamarense*の出現（遊

泳細胞)を確認した。いずれの養殖海域でも常時数百万枚以上の種苗が取引されていることから、これによって移送されている有毒微細藻の量は計算上数百万リットル以上と莫大なものとなる。有毒微細藻はマガキ種苗に餌として取り込まれたのち、カキの体内における消化を免れ、糞として排出された後に速やかに栄養細胞に復帰していることが明らかとなった。Nagai et al. (2007)**により、MSマーカを用いた集団遺伝学的解析より指摘された「*A. tamarense*の海域Aおよび海域B間の個体群は人為的な要因により運ばれ、混合している」という説は、本研究の成果により、強く指示される結果となった。

2) 活魚運搬車による養殖魚介類の海域間輸送の実態把握

西日本のB海域に隣接する1中央卸売市場において実施した。西日本各地から出荷用の活魚輸送車が夜間に到着することから、競りのために荷受け業者に引き渡される際に、輸送に用いられた海水2~5Lを事業者の了承の上で採取し、直ちに研究室に持ち帰った。調査は2006年8月、11月、2007年1月、6月、8月、10月の計6回実施した。採取した海水の有毒微細藻等の有無について顕微鏡下で検鏡・計数した。

全38試料(13県)のうち、25試料から微細藻を検出した。微細藻の種類は珪藻18種、渦鞭毛藻22種、その他4種であった。このうち、有毒微細藻として、5種が含まれていた。活魚輸送車は産地から市場へと毎日のように海域間を移動していること、産地と都市をネットワーク状に移動している。国内で活魚運搬車によって海域間を輸送されている海水量の試算は困難であるが、少なくとも西日本のB海域に隣接した市場に持ち込まれる海水の量は年間数万トンに達すると試算される。

マガキ種苗も活魚運搬車も多量の有毒微細藻を生きたまま運んでいる実態が明らかとなった。これらの人間活動で運ばれる有毒微細藻類は想定外の量に達しており、生物多様性を考えるうえで無視できないほど膨大である。

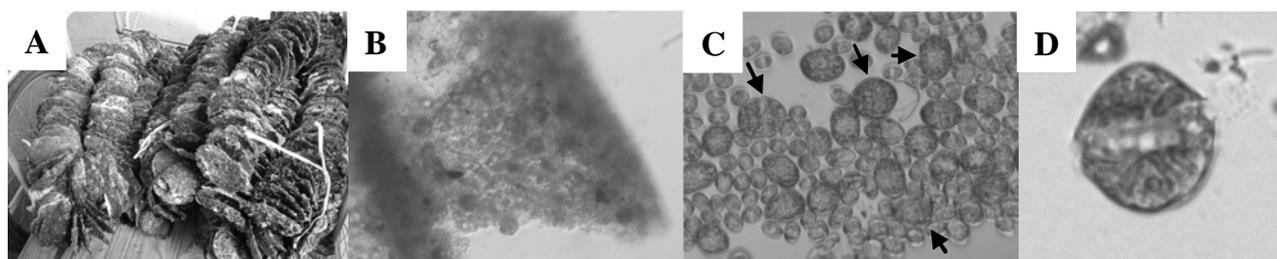


図5. カキ種苗 (A) とカキ稚貝の糞中に大量に含まれる微細藻類 (B) ; 形態が変形しながらも生存する*A. tamarense* (C、矢印) ; 栄養細胞に復活し遊泳する栄養細胞 (D)

4. 考察

平成18-19年度の2年間の研究により、*C. ovata*と*H. circularisquama*の2種について、高度多型を示す10個以上のMSマーカの開発に成功し、これにより各種個体の分子タイピングが可能となった。*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。*H. circularisquama*は、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。MSマーカを用いた個体群分子タイピングにより、天草の個体群は、英虞湾や浜名湖の個体群の一部の個体が、なんらかの理由で運ばれ、増殖したものである可能性が示唆された。また、Fisher's exact testの結果、いずれのペア個体群間においても、有意な集団分化が検出され、本種が日本で初めて確認されて以来、わずか十数年しか経過していないにもかかわらず、既に集団構造に差が見られ、集団の構造化が生じていることが示された。本種のMSマーカの開発は、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クローン培養株のDNAを用いて開発した。わずか3海域の個体群のみしか解析できなかったが、今後、さらに多くの個体群の解析により、個体群間での地理的距離と遺伝距離の関係が明らかになり、わずか20-30年足らずの年月の間に、どの程度の遺伝的分化が進行するのか、分子進化学・集団遺伝学の見地から非常に重要な知見が得られるとともに、その伝搬ルートの解明が進むと期待される。*D. acuminata*および*G. catenatum*の個体群分子タイピングについても、利用可能なMSマーカの数は少ないながら集団分化を示すマーカ

一が得られことから、今後、マーカー数を増やすことで、両種の集団構造を解明できると期待できる。

高度多型分子マーカーを用いた個体群の集団遺伝学的解析は、脊椎・無脊椎動物・魚類・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少ない。既に、研究代表のグループは、日本沿岸域において有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium 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**。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マーカー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。

一般的に *A. tamarense* のような有毒微細藻の輸送は、耐久性の高い休眠胞子（シスト）の形態が主流であると想定されてきた。しかしながら今回の調査ではマガキ種苗からシストを検出することはできず、種苗の移植に伴う輸送が栄養細胞の形態で行われていることが明らかとなった。しかもそれらの多くが海水の存在しない環境で最大2昼夜を経過し1280kmもの距離を運ばれてきたにも拘わらず、二枚貝消化管内を通過して排出された糞の中から見出されることから、二枚貝は移植を通して有害・有毒微細藻類の生物キャリアとして機能し、分布拡大の原因の一端を担ってきた可能性が高い。サブテーマ2では、培養法と顕微鏡観察・分子同定法を組み合わせた植物プランクトンのモニタリングを行い、そのために必要な操作・処理法をマニュアルとして確立した。今後さらに他の貝類についても輸送の実態を把握することで、海域を越えた移植が盛んに行われている貝類の有害・有毒微細藻類の生物キャリアとしての実態について、さらに知見を蓄積していきたい。

活魚輸送車は刺身など生の魚食文化のある日本独特の輸送形態である。一中央卸売市場での活魚運搬車の日あたりの入荷台数は把握できていないが、少なくとも調査時は2~10トンの活魚運搬車が十数台往来しており、3回の調査の平均で一日あたり少なくとも100トン程度の海水が海域間輸送されている計算となった。市場は年間330日程度運営されているため、年間あたりで少なくとも3万トン以上の海水が海域間を輸送されている。従来活魚運搬車による有毒微細藻の輸送は把握されていなかったため、本サブテーマで確立した調査手法を基本としつつ、モニタリングに必要なマニュアルを提示したい。既にろ過海水を飼育水に利用している事業者もあることから、活魚運搬車の移送にろ過海水の使用を呼びかけることが政策的に有効である。

** 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.

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- 1) 2年間の研究により、*C. ovata* と *H. circularisquama* の2種について、高度多型を示す10個以上のMSマーカーの開発に成功し、これにより各種個体の分子タイピングが可能となった。他の2種についてもマーカー数は少ないながらMSマーカーの開発に成功し、これらを用いた解析により有意な集団分化を示すことが確認できた。従って、今後さらに多くの個体群の解析を進めることにより、分布拡大に及ぼす要因が明らかになると期待できる。
- 2) 植物プランクトンの研究史以来、培養が不可能とされてきた *Dinophysis* 属の複数の種について、継代培養が可能となったことは、本研究の大きな成果であり、特に *D. fortii* の培養成功については、現時点で世界初の快挙である。原因種の培養が長い間できず、本属の増殖生理・生態、毒生産能などについて多くが不明であったが、今後、世界中の研究者が注目する研究へと進展することが期待される。
- 3) 二枚貝種苗、特にマガキ種苗による輸送を、実際の人間活動の中で定量的に証明した。Nagai et al. (2007)**により、MSマーカーを用いた集団遺伝学的解析より指摘された「*A. tamarense* の海域Aおよび海域B間の個体群は人為的な要因により運ばれ、混合している」という説は、本研究の成果により、強く指示される結果となった。従来考えられていたシストなど耐久性のあるステージではなく、ほとんどが遊泳細胞などの形態で生きたまま海域間を輸送されていたこと、二枚貝

種苗の体内に有毒微細藻が濃縮され、消化を免れて生きたまま糞とともに排出されているなど、これまでほとんど解明されていなかった現象を捉えることができた。諸外国でも養殖業の拡大と有毒微細藻の拡大との関係が指摘され、バラスト水以外のルートとして二枚貝種苗の移送が取り上げられつつある。カキ類の種苗は国境を越えて売買されている実態もあることから、今後国際共同研究などを通して実態把握に努める必要がある。また、これまで海域間の輸送ルートとして全く認知されていなかった活魚運搬車による移送を明らかにした。調査した活魚運搬車の75%が未ろ過の現場海水を運んでおり、その中の有毒微細藻の大半が生残していたことから、有毒微細藻の新たな輸送ルートとして注目される。

(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。また、これらの研究を日本国内だけに留めず、現在、複数の国の研究者と国際共同研究を展開している。

二枚貝種苗の海域間輸送については、国際獣疫事務局（OIE）が定めた国際条約で指定されてる病原微生物が検出された場合のみ規制を受けるものの、有毒微細藻などを基準とした防疫体制は未整備である。数百万リットル以上にも相当する現場海水中に存在する有毒微細藻が日常的に海域間を飛び越えて輸送されている実態が明らかになったため、生態系攪乱に与える影響を最小限にする必要がある。ただしこれらの規制は実際の経済活動に大きな影響を与えるため、今後関係省庁や自治体、生産者団体とも慎重な協議を行い、得られた成果を持って実情を公表するとともに、防疫体制を整え、さらには生物多様性の保全のために必要となるモニタリング体制の整備に勤めて行きたい。活魚運搬車については輸送ルートとして全く認識されていなかったため、同様に今後関係省庁や自治体、生産者団体とも協議を行い、リスク低減に効果のあるろ過海水への切り替えを促して行きたい。

6. 研究者略歴

課題代表者：長井 敏

1967年生まれ、水産大学校増殖学科卒業、農学博士、現在、（独）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主任研究員

主要参画研究者

(1)：松山幸彦

1968年生まれ、鹿児島大学水産学部卒業、農学博士、現在、（独）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主任研究員

7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況）

(1)査読付き論文

- 1) Nagai S, Nishitani G, Tomaru Y, Yamaguchi S, Kamiyama T (2008). 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 (2008). Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis caudata* (Dinophyceae). *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.

(2)査読付論文に準ずる成果発表（社会科学系の課題のみ記載可） なし