麻痺性貝毒の起源——海産渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属

左子芳彦*
金 昌勲
石田祐三郎

環境汚染や貨物船のバラスト水により世界中で頻発する麻痺性貝毒 (PSP) の原因藻 *Alexandrium* は、謎の多い生物である。PSP の起源と考えられながらも、困難な培養、多数の毒群と複雑な分析法、未知なる毒生合成系、PSP 産生菌の存在などにより混乱が続いていた。最近、本藻の無菌・クローン培養株の確立と交配による種雑株の出現で遺伝解析の基礎ができ、本藻起源説を強固にするとともに PSP 研究に新しい視点が加わった。

周囲を海に囲まれ寒流および暖流系を有することから、日本は古来から水産資源に恵まれ、魚介類を食してきた。近年は、伝統的な増養殖に加えて、バイオテクノロジーによる水産生物の育種が盛んである。しかし、急速な産業の発展に伴う工場廃水や生活排水、さらには養殖漁場の自家汚染による沿岸海域の富栄養化は、有害・有毒微細藻類による赤潮をひき起こし養殖魚介類の大量斃死や毒化の被害を招いている。とりわけ麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison, PSP) の最大の原因藻と考えられる渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属 (旧属名 *Protogonyaulax*) は毎年発生を繰り返し、北海道や東北の三陸海岸では頻繁に二枚貝を毒化させ⁽¹⁾出荷停止となり、本年は広島県のカキやアサリにも毒化による被害を及ぼしている。渦鞭毛藻による毒化被害は日本のみならず世界中で頻発しており⁽²⁾、原因究明と被害の防止は急務となっている。

麻痺性貝毒は渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属や *Gymnodinium catenatum* が生産する強力な一群の神経毒で、図 1 に示すようなサキントキシン (STX) と多くの同属体を含む^(3,4)。そしてこれを餌とする二枚貝が毒化し、それを摂食したヒトがフグ中毒と酷似した死亡率の高い食中毒を起こすのである。しかも海水 1 l 当たり数百細胞の発生量で十分毒化することから赤潮現象を呈さず、水産庁が行なっているような厳密な毒化のモニタリ

ングが必要である。また最近では、沿岸海域の海水を貨物船が船の安定のために船倉にバラスト水として入れ、これに原因藻のシスト (休眠接合子) が含まれ、行く先々に運ばれ世界中に汚染が拡大されているのでは、と危惧されている^(4,5)。この

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	比毒性 (MU/ μmol)
STX	H	H	H	CONH ₂	2483
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂	2295
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	2463
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	892
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	1584
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	1803
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	160
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	180
epiGTX8(C1)	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	16
GTX8(C2)	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	239
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	33
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	143
dcSTX	H	H	H	H	1274
dcneoSTX	OH	H	H	H	30
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	1200
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	382
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	935
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	900

図 1 ■ 麻痺性貝毒群の構造と比毒性

比毒性は 1 μmol 当りのマウス単位 (MU) を示す (1 MU は 10 g の ddy 系雄マウスを腹腔内投与後 30 分で殺す毒量)。STX : サキントキシン, neoSTX : ネオサキントキシン, GTX : ギニオトキシン, dc は脱カルバモイル体を示す^(4,29)。

Origin of Paralytic Shellfish Poisoning—Marine Dinoflagellate *Alexandrium*

* Yoshihiko SAKO, Chang Hoon KIM, Yuzaburo ISHIDA, 京都大学農学部

ような背景から、特に日本や北米において多くの先駆的研究がなされ、その化学構造や性状ならびに生理作用がほぼ解明されている。しかし、原因藻の無菌培養が困難であるため、その生物学的特徴や毒生産機構ならびに毒の生合成系については研究がほとんど手つかずのままである。

そのような状況下で、近年になって *Alexandrium* 培養株の同一クローン内に大きな毒量の差があることや、*Alexandrium* の消長と貝の毒化の間に相関が見いだされることがあることなどから、PSP 生産は本藻の遺伝的形質ではないとする報告も出された⁽⁶⁾。またそれを裏付けるかのように、毒株の核内に共生細菌がいるという報告⁽⁷⁾や、毒量はきわめて低いものの細菌が PSP を生産しているとの報告もなされている⁽⁸⁾。しかし、その共生細菌の数は核中に数個であり、そのうえすべての細胞に見いだされるわけでもない。また、一般の細菌からも PSP 生産菌が見いだされているが、これらの毒量は *Alexandrium* 属に比べるときわめて低く、また必ずしも増殖に伴って生産されないことから、貝類の毒化に寄与しているのかどうかは明らかでない。

現在、毎年のように世界中で報じられる麻痺性貝毒と有毒渦鞭毛藻の発生量には、ほとんどの場合きわめて高い相関関係が認められ、最大の原因生物として *Alexandrium* 属（海域によっては *G. catenatum*）を除去することは不相当と考えられる。

そこで筆者らは、従来困難であった *Alexandrium* 属の完全な無菌・クローン培養株を多数分離し、まず生活環を明らかにし、モノクローナル抗体やアイソザイム分析によって分類的位置を確定したのち、それらの株の増殖のステージや細胞の生理的状态によって PSP 毒の総量や毒組成が変化するのか否か、また表現形質である毒の組成が子孫に継代される遺伝的形質として用いることができるのか否かを詳細に検討した。

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の生態・生理

渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属は熱帯から寒帯地方に至るまで世界中に広く分布し、沿岸域を主な生

息域としている。発生時期は海域によって異なり、発生期の水温も海域や種によって 5~30℃ と広い温度域にまたがっている。日本においては、毒性の強い *A. tamarense* は北海道や三陸沿岸を中心とする北日本で多く見られ、少し毒性の弱い *A. catenella* は主に西日本で発生が確認されている。岩手県大船渡湾では、両種が時期的に棲み分けており、春には *A. tamarense* が、秋には *A. catenella* が毎年発生し、養殖二枚貝の毒化が深刻な問題となっている⁽⁹⁾。両種が混在する海域は、カナダのバンクーバーアイランド近海においても見られ⁽¹⁰⁾、いずれも本藻の栄養細胞に加えて、海底からは多くのシストの存在が報告されている。有性生殖により形成されたシストは低温(2~5℃)や光のない状態でも生存可能で、多くの場合、越冬して翌年の発生の“種 (seed population)”として本藻の分布拡大に重要な役割を果たしている⁽¹¹⁾。

次に、*Alexandrium* 属の分類学的問題について述べよう。本藻はこのような毒化をひき起こすことから、現場におけるモニタリングには迅速かつ正確な分類が必要であるが、現在に至るまで混乱が続いており、解決されていない。一般に微細藻の分類同定には今日まで形態観察のみが重要視され、研究者により分類基準が異なったり、形態に変異が認められるため、しばしば混乱が生じてきた。とりわけ有毒渦鞭毛藻には形態的に酷似した種が多く、海域による変異や培養による形態変化が認められるため、分類学的には長い間混乱を極め、同一種に4つの異なる属名が存在したが、1989年の国際会議でようやく *Alexandrium* という属名を用いることで一応の合意をみた⁽¹²⁾。しかし、種名における合意は手つかずで、より客観的手法が求められている。現在のところ、単一で絶対的な方法が存在しないため、目的に応じてアイソザイム分析、免疫学的識別および DNA 塩基配列などの情報を併用することによって、種間・種内の生化学的な識別がなされ始めている^(13~16)。

筆者らはまず、岩手県大船渡湾や和歌山県田辺湾の底泥より *Alexandrium* 属のシストを多数分離し、それぞれ発芽後 2~8 分裂した各細胞をク

図 2 ■ 有毒渦鞭毛藻 *A. catenella* の顕微鏡写真

A: 連鎖栄養細胞, B: 接合中, C: シスト, D: シストの発芽. スケールバー=20 μ m

ローンとして分離・培養し、さらに無菌化し、無菌・クローン培養株を確立した。これを一定条件で培養後、藻体を破碎して得た粗酵素をポリアクリルアミドゲル電気泳動によりアイソザイム分析を行なった。その結果、検討した酵素すべてについて複数のアイソザイムが認められ、遺伝的多型現象 (polymorphism) がみられた。そこで相類似度マトリックスより、デンドログラムを作製して群分析を行なったところ、すべての株は産地のいかににかかわらず2つの異なったグループに分けられた。これらは各々形態学的分類による *A. catenella* および *A. tamarense* に相当した。各々のグループ内における相類似度は高く、両グループには明白な遺伝的差異が認められた^(13,14)。

次に *Alexandrium* 属の鎧板 (thecal plate) と

呼ばれる細胞の外殻に特異的に反応するモノクローナル抗体 10 株を作製して、本属の種間・種内識別を行なった。その結果、*A. catenella* のみ、または *A. tamarense* のみ、あるいは両種に反応する抗体が得られ、日本産の両種については形態やアイソザイム分析による分類を支持する結果が得られた^(15,17,18)。さらにヘテロタリック (雌雄異株接合) な有性生殖を利用した交配実験による結果も上記の結果と一致していた。しかし、形態学的に *A. tamarense* と分類されたタイ産株は、免疫学的には明確に日本産同種と識別されたことから⁽¹⁹⁾、本抗体によって産地の違いによる種内識別が可能となった。現在これらの抗体とフローサイトメトリーを用いて *Alexandrium* 属の迅速モニタリングシステムの開発を進めている。また、こ

図 3 ■ *A. catenella* の生活環

これらの結果が遺伝的にも正しいかどうかを確かめるため、rRNA や RuBisCo 遺伝子の DNA シーケンスの比較などを現在行なっている。

以上のように、分類同定法においてはまだ多くの問題点が残されているが、本属の有性生殖を有する生活環については培養系によりほぼ明らかになっている^(20~22)。有毒渦鞭毛藻 *A. catenella* および *A. tamarense* の有性生殖はともに雌雄（交配型+、-）異株でヘテロタリズムを示し、両株を混合することにより接合が開始される。ここでは、*A. catenella* の生活環について紹介する。

図 2 に *A. catenella* の生活環の顕微鏡写真を示した⁽¹⁸⁾。*A. catenella* の栄養細胞は体長約 30 μm で鎧板で包まれ、多くの色素顆粒と葉緑体を有している。対数増殖期には単独の細胞以外に分裂中の 2, 4, まれに 8 細胞の連鎖群体が認められる。クローン培養株では栄養細胞(n ; ハプロイド)は無性的に分裂を繰り返すが、株間で交配実験を行なうと、接合によるシスト($2n$, 休眠接合子)形成が起こる組み合わせと起こらない組み合わせが存在し、ヘテロタリズムを示す。両交配型を混合すると、接合が開始され遊泳を伴いながら接合が進

行し、やがて接合を完了して運動性接合子を形成する。その後、運動性を失って沈み、非運動性のシストが形成される。現場海域では底泥より多くのシストが見いだされ、発芽能を有することが知られている⁽¹¹⁾。次に成熟シストを 5°C、暗条件で 1 カ月間低温処理後、常温(20°C)に戻すと発芽が開始され、1 個体の発芽細胞が泳ぎ出る。発芽細胞はやがて 2 個の栄養細胞に分裂するが、この細胞は交配型がすでに決定されており、それぞれを別々に培養すると栄養塩などの環境条件が整えば無性的な栄養増殖を繰り返す。図 3 は、*A. catenella* の生活環をまとめたものである。*A. tamarense*

も、本種と同様なヘテロタリズムの生活環を有することが明らかになっている⁽²²⁾。

Alexandrium 属は細菌のように寒天プレート上では増殖しないため、分離はクリーンベンチ内の倒立顕微鏡を用いてキャピラリーにより 1 細胞ずつ分離洗浄を繰り返して行なわねばならない。このように物理的ショックに弱い上に最大増殖(10^4 cells/ml)には約 4 週間を要するため、無菌・クローン培養の確立維持にはきわめて多くの労力とテクニックを必要とし、本研究の律速となってきた。筆者らはこのようにして確立した無菌・クローン培養系を用いて、増殖条件や増殖段階ならびに集藻する時間(明暗期の時間により毒量に変化する)を厳密にそろえて PSP 毒の分析を行ない、毒生産が本藻の遺伝的形質に依存するかどうかを探った。

麻痺性貝毒の起源

1. 増殖段階における毒量および毒組成の変化

PSP の原因生物を明らかにすべく *Alexandrium* 属の培養株において、毒量および毒組成の変化については、多くの報告がなされてきた。それらのほとんどは無菌株ではなく、そのうえクロー

ン株でない場合も見られたが、いずれも PSP 毒の総量は、培養条件や増殖段階に伴って変化が見られている⁽²³⁻²⁸⁾。細胞当たりの PSP 毒量は一般に本藻の対数増殖段階で急上昇し、以後、時間の経過に伴い減少する傾向が認められている。

しかし、毒組成に関しては、一定であるという報告^(24,25)と、変化するという報告^(26,27)があり、両者の主張は平行線をたどっている。これは培養株、培養条件や分析法の不統一によりもたらされたもので、結果の客観的比較が困難な状態にあることを物語っている。

そこで、上述の無菌・クローン株（ここに使用した株には細菌の共生は認められていない）を用いて、24 時間内の明暗サイクル期間の細胞および各増殖段階の細胞における毒量ならびに毒組成を詳細に分析した。培養は SWIIIm 培地⁽¹⁸⁾を用いた標準培養条件（15 または 20℃, 14 時間明：10 時間暗の明暗サイクル, 100 μ Einsteins $m^{-2} s^{-1}$ ）下で行なった。PSP の分析定量は大島の方法によった⁽²⁹⁾。すなわち、およそ 10^5 細胞の *Al-exandrium* 藻体を集め、酢酸（0.05 N）存在下で超音波破碎により PSP を抽出し、分子量 1 万で限外濾過後、逆相カラム（C8）を用いて 3 種の移動相により PSP 全成分の HPLC 蛍光分析を行なった。本法の検出限界は成分により異なるが、0.02~0.1 pmol ときわめて感度が高いことが特徴である⁽⁴⁾。

まず、明暗サイクルに伴う 1 日の細胞周期における毒量と毒組成の変化を調べると、主な細胞分裂（全細胞の 40~50%）は暗期の後半から明期の前半にかけて行なわれ、1 細胞当たりの毒量は、明期から暗期にかけて増加を示し、細胞分裂の始まる暗期の後半から急に減少した。その際の各々の毒組成の比（mol%）は、明暗周期を問わずほぼ一定であり、これらの結果は *A. catenella* およ

図 4 ■ 増殖過程における *A. tamarensis* OFX 151 (A, B) および *A. catenella* TNY 7 (C, D) の生産する PSP 毒量と毒組成比の変化

A, C: ● 細胞数 (cells/ml), ▲ 総毒量 (fmol/cell). B, D: ▲ GTX1+4, + GTX2+3, ● GTX5, ■ C1+C2, ▼ C4, × neoSTX, ○ STX

び *A. tamarensis* の両種で認められた⁽³⁰⁾。毒分析が若干異なるが、北米産の *A. tamarensis* を用いても同様な結果が報告されている⁽³¹⁾。

次に、増殖過程における毒量と毒組成を、異なった海域からの多数の株を用いて、種、株、産地、および交配型間で詳細に比較検討を行なった。

図 4 には、代表的な例として大船渡湾産の *A. tamarensis* OFX 151 と田辺湾産の *A. catenella* TNY 7 株の増殖過程と PSP の総毒量および毒組成比の変化を示した⁽³⁰⁾。*A. tamarensis* では、細胞当たりの総毒量は遅滞期の後期から急激な増加が見られ、対数増殖初期から中期に最大（31~61 fmol）に達した。以後急激に減少し定常期にはほぼ安定した（図 4-A）。また毒量の増加または減少が起こる期間の増殖速度と毒生産率を比較すると、それらには一定の相関が認められず、毒量の減少期には毒生産率も低いことが明らかになった。本種の毒組成の主成分として GTX（ゴニトキシン）4 と C2（GTX8）が、また微量成分として GTX1, 2, 3, C4 および neoSTX（ネオサキントキシン）が含まれていた。1 細胞当たりの総毒量はこのように増殖過程において変化した、各々の毒組成比はほぼ一定であった（図 4-B）。

図 4-C には田辺湾産の *A. catenella* の毒量と増殖の関係を示した。対数増殖初期から中期に毒量は急上昇して最大(約 20 fmol)に達し、以後急激に減少し、定常期には 5 fmol 以下でほぼ安定した。毒生産率は *A. tamarens* と同様に毒量の上昇期に高く、減少期に低い値を示した。後述するように本種の毒組成は田辺湾産と播磨灘産のものはよく似ていたが、大船渡湾産のものとは差異がみられた。田辺湾産株の毒組成の主成分としては GTX 4, 5 および C2 を、微量成分として GTX 1, 3, C1 (epi GTX 8) および STX を含んでいた。細胞当たりの各毒組成比は、いずれの株でも定常期にやや増減はあるもののほぼ一定であった(図 4-D)。

両種合わせて 30 株以上の無菌・クローン培養株を用いて、増殖過程における毒量および毒組成の変化を詳細に検討したところ、次のような結論に達した。*A. catenella* および *A. tamarens* の増殖過程における細胞当たりの毒量の変化は、対数増殖初期から中期にかけて顕著な増加を示し、その後定常期にかけて著しい低下を示す。しかしこれらの過程において PSP 毒の各々の毒組成比はほぼ一定であった。これらの結果から *Alexandrium* 属における PSP 毒生産は本藻類固有のものであることが強く示唆された⁽³²⁾。

2. 毒組成における地域性

前述したように、*Alexandrium* 属の各株が有する毒組成は増殖段階にかかわらず一定であることが明らかになった。そこで、毒組成比を指標として、地域性あるいは系群が存在するか否かを、シストから得た無菌・クローン株の大船渡湾産の *A. tamarens* と *A. catenella*、田辺湾産の *A.*

図 5 ■ 異なった海域から分離された *A. tamarens* (A) と *A. catenella* (B, C, D) の生産する PSP 毒組成の比較

A: 大船渡湾産のシストから発芽後分離した 10 株, B: 大船渡湾産のシストから発芽後分離した 6 株, C: 田辺湾産のシストから発芽後分離した 10 株, D: 播磨灘産の栄養細胞より分離した 5 株。標準培養条件下での各毒成分の平均 mol % と標準偏差を示した。

catenella, それに栄養細胞から得た無菌・クローン株の播磨灘産の *A. catenella* を加えて検討した⁽³³⁾。

まず、総毒量について見ると、同一シストから分離された交配型の異なる株間では、*A. tamarens* においてはシストから発芽した F_1 (雑種) 株は 1 組の例を除いて、交配型とは無関係に毒量がよく似ていたが、異なるシストから得られた F_1 株の毒量には差異が見られた。*A. catenella* においても、多くの場合、同一シスト由来の F_1 株では総毒量はよく似ていたが、場合によっては 2 倍程度の差異が見られることがあった。とりわけ、大船渡湾産の *A. catenella* の毒量は、田辺湾や播磨灘産の本種に比べると平均約 1.7~1.8 倍高い値を示し、株によっては約 4 倍の差が認められた。

一方、毒組成比について各々の株の分離された地域、種ごとに整理して平均した結果をまとめる

と図5のようになる。種によって、また分離された地域によって毒組成に違いがあることが認められる⁽³³⁾。すなわち、同地域で分離されても種によって毒組成は異なり、また同種であっても地域によって毒組成が異なったり類似している場合のあらが明らかにになった。

各毒成分についてさらに詳細に見ると、田辺湾産の *A. catenella* は毒性の低い *N*-スルホカルバモイル毒群 (GTX 5, 6, C1~C4) が高い割合 (約 90%) で含まれるのに対して、大船渡湾産ではその割合は *A. tamarense* で約 60%, *A. catenella* で約 35% であった。田辺湾産の *A. catenella* の毒組成比は、地理的に近い播磨灘産 *A. catenella* のそれにほぼ一致していた。しかし、大船渡湾産の *A. catenella* では田辺湾産で高い割合を示す GTX 1, 4, 6 を欠き、GTX 5 もきわめて少ないが、田辺湾産でほとんど認められない neo-STX を主成分として含んでいた。大船渡湾産の *A. tamarense* 個体群は、C1~C4 を欠損している 1 株を除いて主成分として C2 (46~69 mol%) と GTX 4 (11~30 mol%), 微量成分として GTX 1, 2, 3 および neoSTX または稀に dcSTX と STX を含んでいた。

このような分離地域による毒組成の違いは、日本⁽³⁴⁾、北米⁽³⁵⁾をはじめ他の地域^(4,36,37)の分離株においても示唆されているが、大島らの報告^(4,37)や筆者らの結果⁽³³⁾を除いて、毒分析法や培養株のクローン性について問題が多い。上記の結果より、地理的に離れた地域から分離された *Alexandrium* 属は、先に示したモノクローナル抗体、アイソザイム分析などによって同一種と同定された場合でも異なった毒組成を有することがあり、数年にわたる調査からその毒組成は遺伝的に安定していることが示唆された。

しかし、地域によっては個体群における毒組成の多様性が示されている^(36,37)。本研究においても、同一の天然シストから発芽して得られた *A. tamarense* の 2 株 (OFX 151 と OFY 152) は、交配型が異なる以外に毒組成比が大きく異なり (OFY 152 株は C1~C4 を欠く)、同一地域内において同種でありながら異なる毒組成を示す個体

群が存在することを示している。すなわち、すでに示したように、本藻の有性生殖がヘテロタリズムであるという特性、また増殖過程における毒組成の安定性などから見て OFY 152 株が特異な変異株ではなく、同地域における毒組成において遺伝的に異なる個体群の存在 (genotypic heterogeneity) の可能性を示すものである。

一方 Cembella ら⁽³⁸⁾は、異なった地域から分離された *A. tamarense* と *A. catenella* の毒組成からは、種間識別は不可能であると指摘しているが、恐らく上記のようなケースが系群で起こっているからであろう。しかし、本研究は多少の例外はあるとしても毒組成の差異による地域間の個体群の識別ならびに変動の識別が可能であることを示唆している。

3. 雑種株による毒組成の遺伝解析

これまでの多くの研究では、*Alexandrium* 属の生産する STX およびその誘導体群から成る PSP 毒の毒量のみならず、毒成分も種間・種内において違いがあるという報告もなされている。また同じ培養株でも、毒量は温度や栄養塩といった培養条件に依存して変化し、増殖過程によっても変動することが示された^(23-28,37,39)。しかし、筆者らの研究により、多くの無菌・クローン株を用いて培養条件を一定にすると増殖過程における毒組成比が一定であることが明らかになった⁽³⁰⁾。また、これらの株の継代培養を永年続けても毒成分にほとんど変化が認められないことから、本藻において毒生産能が遺伝的要因に基づくものであることが強く示唆された。しかし、冒頭でも述べたように、本藻に共生または共存する細菌により PSP 毒が生産されているとする説が出されている^(7,8)。

そこで、PSP 毒が *Alexandrium* 属によって生産されていることを証明するために、ヘテロタリズムによる有性生殖を利用して PSP 毒成分の遺伝様式の解析を試みた。すなわち、表現型として毒成分が DNA の情報に従って生産された酵素群によって生産されているとすれば、接合によって生じた雑種株に毒成分の遺伝的伝達が確認され

表 1 ■ *A. catenella* の親株および F₁ 株における毒組成*

毒組成	親株	親株	F ₁ 株	F ₁ 株
	OFX072 (mt+)	TNY7 (mt-)	TOY727-1 (mt-)	TOX727-2 (mt+)
GTX1	—	0.15	—	—
GTX2	—	—	—	—
GTX3	Tr	0.05	0.04	Tr
GTX4	—	2.76	0.72	—
GTX5	0.21	7.52	5.25	0.16
GTX6	—	0.24	—	—
epiGTX8(C1)	0.15	0.26	0.07	0.28
GTX8(C2)	5.33	4.99	4.77	5.54
C3	—	—	—	—
C4	—	0.48	0.36	—
neoSTX	6.84	—	—	7.49
dcSTX	—	—	—	—
STX	1.43	—	—	1.57
Total toxins	13.96	16.45	11.21	15.04

* すべての毒量は fmol/cell で示した。Tr: 微量, —: 検出されず。

ると考えられる。そこで、ヘテロタリズムによる接合が高頻度で認められる両交配型の組合せの中から、毒組成の異なる株を選んで接合させ、発芽後 F₁ 株を分離して毒分析を行ない毒組成の遺伝様式を検討した。従来、*Alexandrium* 属の培養株における接合率はきわめて低く、雑種株を得るのに長期間要するため、このような試みはまったくなされていなかった。

接合には *A. tamarense* ならびに *A. catenella* の両種から毒組成の同じまたは異なる交配型を組合わせて、接合によって得られたシストを低温処理 (4°C, 3~4 週間) 後、1 個ずつシストを分離して 20°C で標準培養条件下で培養を行なった。シストから発芽した栄養細胞を 1 個ずつ分離して、無菌・クローン株を確立した。その後、交配実験により有性生殖における交配型を決定し、PSP 毒を HPLC 蛍光法にて分析した。

現在 4 組の代表的な組合わせで多くの F₁ 株が、また一部の組合わせで F₂ 株が分離されており、その増殖過程における毒組成比は親株と同様にほぼ一定であった^(38,39)。そこで両親株と異なった交配型を示す F₁ 株の間で各毒成分の比較を行なった。その結果、両種ともに親株間の毒組成が同一または相似している場合、すべての F₁ 株における毒組成は交配型に関係なく親株とほぼ同一

表 2 ■ *A. catenella* の親株および雑種株における毒型と交配型の関係

親株の組合 わせ	交配型	毒型	シス ト数	F ₁ の株数	交配型	毒型
-TNX22	mt+	A ^a	1	1	mt-	A
-OFY101	mt-	B ^b		1	mt+	B
-TNY7	mt-	A	17	9	mt+	A
-OFX072	mt+	C ^c		8	mt-	A
				8	mt+	C
				9	mt-	C

^a A 型: GTX 3, 4, 5, 8 および C4 を主に生産する。
^b B 型: GTX 3, 8, STX および neoSTX を生産する。
^c C 型: GTX 5, 8, STX および neoSTX を生産する。

であった⁽³⁹⁾。

次に親株の毒組成が異なる場合の例を *A. catenella* について紹介する。表 1 に大船渡湾産 OFX 072 株 (mt+: 交配型+) と田辺湾産 TNY 7 株 (mt-: 交配型-) を交配させて、生じた F₁ 株 TOY 727-1 株 (mt-) と TOX 727-2 株 (mt+) の PSP 毒の組成について示した。OFX 072 株は neoSTX と STX を有するが GTX 4 と C4 を含まず、TNY 7 株は GTX 4 と C4 を含むが neoSTX と STX は含まないという違いが見られ、その F₁ 株は親株のどちらかの毒組成のパターンを示した⁽³⁸⁾。したがって、親株の異なった毒組成が F₁ 株に伝達されていることが明らかになった。

表 2 には、他の毒組成を有する親株の組合わせや、より多くの F₁ 株で毒組成がどのように雑種株に伝わるかを交配型との関係でまとめたものである⁽³⁸⁾。これらの結果より、異なった毒組成を有する *A. catenella* の交配によって生じた F₁ 株の毒組成は、1:1 の両親型 (biparental) でメンデル型の遺伝様式に従うことが明らかになった。このような現象は *A. tamarense* においても認められている。したがって、*Alexandrium* 属の毒の生合成に関与する酵素遺伝子が母性や父性遺伝しないことから、核の染色体 DNA に組み込まれていると推察される。また交配型と毒組成の伝達は無関係であることから、毒合成の遺伝子は交配型の遺伝子座と連鎖していない別々の染色体にあるものと結論された。なお、TNY 7 株と OFX 072 株との交配によって生じた F₁ 株にはまれに親株と異なる毒組成をもつ株が得られる。これは F₂

株や BC₁ 株 (逆交配) による結果から遺伝子の相互組換えが起こっていることが示唆された。このような現象が、現場における本藻個体群の毒組成を複雑にしている要因かもしれない。

現在筆者らは、PSP 毒群の生合成および変換酵素の検索を開始しており、硫酸基転移活性を本藻の粗酵素液中に認めている。今後はこれらの酵素を精製しその遺伝子解析を行なうことにより、複雑な PSP 毒群の生合成や制御について明らかにしてゆきたい。

*

魚介類を古来より食してきた日本では、二枚貝による麻痺性貝毒は食品衛生上きわめて重要な問題であり、多くの研究と防除や対策が行なわれてきた。しかし、環境汚染やバラスト水による原因生物の分布拡大はこのような貝毒をより深刻な問題としている。有害・有毒微細藻や赤潮の研究で世界のトップを走る日本は、今後これらに関する情報や研究を整理・集約するとともに、原因生物の毒生産のメカニズムの解析はもちろんのこと、これら藻類の収集保存と毒分析や対策に関するデータベースを蓄積して、国際貢献を果たしたいものである。本稿が、少しでもこれらの研究に関心を示していただけるきっかけになれば幸いである。

文献

- 1) K. Hashimoto & T. Noguchi : *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 7 (1989).
- 2) D. M. Anderson : "Red Tides", ed. by T. Okaichi *et al.*, Elsevier, New York, 1989, p. 11.
- 3) 安元 健 : "海洋微生物とバイオテクノロジー", 清水 潮編, 技報堂, 1991, p. 119.
- 4) 大島泰克 : "化学で探る海洋微生物の謎", 安元 健編, 化学同人, 1992, p. 37.
- 5) G. M. Hallegraeff, C. J. Bolch, J. Bryan & B. Koerbin : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by E. Graneli *et al.*, Elsevier, New York, 1990, p. 475.
- 6) T. Ogata, M. Kodama & T. Ishimaru : *Toxicon*, **25**, 923 (1987).
- 7) M. Kodama : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by E. Graneli *et al.*, Elsevier, New York, 1990, p. 52.
- 8) M. Kodama, T. Ogata, S. Sakamoto, S. Sato, T. Honda & T. Miwatani : *Toxicon*, **28**, 707 (1990).
- 9) 大島泰克 : "有毒プランクトン——発生・作用・機構・毒成分", 日本水産学会編, 恒星社厚生閣, 1982, p. 73.
- 10) A. D. Cembella & F. J. R. Taylor : "Toxic Dinoflagellates", ed. by D. M. Anderson *et al.*, Elsevier, New York, 1985, p. 55.
- 11) D. M. Anderson & D. Wall : *J. Phycol.*, **14**, 224 (1978).
- 12) K. A. Steidinger : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by E. Graneli *et al.*, Elsevier, New York, 1990, p. 11.
- 13) Y. Sako, C. H. Kim, H. Ninomiya, M. Adachi & Y. Ishida : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by E. Graneli *et al.*, Elsevier, New York, 1990, p. 320.
- 14) 左子芳彦, 足立真佐雄, 石田祐三郎 : "微生物の生態 19", 学会出版センター, 1992, p. 61.
- 15) Y. Sako, M. Adachi & Y. Ishida : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by T. J. Smayda and Y. Shimizu, Elsevier, 1992, in press.
- 16) C. Destombe, A. D. Cembella, C. A. Murphy & M. A. Rogan : *Phycologia*, **31**, 121 (1992).
- 17) Y. Sako, M. Adachi & Y. Ishida : *J. Phycol.*, 投稿中.
- 18) 左子芳彦 : *Cell Science*, **8**, 17 (1992).
- 19) M. Adachi, Y. Sako & Y. Ishida : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 投稿中.
- 20) 吉松定昭 : 日本プランクトン学会報, **28**, 131 (1981).
- 21) 左子芳彦, 石田祐三郎 : "微生物の生態 14", 学会出版センター, 1986, p. 99.
- 22) 左子芳彦 : 海洋科学, **20**, 80 (1988).
- 23) Y. Oshima & T. Yasumoto : "Toxic Dinoflagellate Blooms", ed. by D. L. Taylor & H. H. Seliger, Elsevier, New York, 1978, p. 377.
- 24) T. Ogata, T. Ishimaru & M. Kodama : *Mar. Biol.*, **95**, 217 (1987).
- 25) G. L. Boyer, J. J. Sullivan, R. J. Anderson, P. J. Harrison & F. J. R. Taylor : *Mar. Biol.*, **96**, 123 (1987).
- 26) B. A. Boczar, M. K. Belitler, J. Liston, J. J. Sullivan & R. A. Cattolico : *Plant Physiol.*, **88**, 1285 (1988).
- 27) D. M. Anderson, D. M. Kulis, J. J. Sullivan & S. Hall : *Toxicon*, **28**, 885 (1990).
- 28) D. M. Anderson, D. M. Kulis, J. J. Sullivan, S. Hall & C. Lee : *Mar. Biol.*, **104**, 511 (1990).
- 29) Y. Oshima, K. Sugino & T. Yasumoto : Proceedings of the 7th International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, ed. by S. Natori *et al.*, Elsevier, Amsterdam, 1989, p. 319.
- 30) C. H. Kim, Y. Sako & Y. Ishida : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 投稿中.
- 31) D. M. Anderson & D. M. Kulis : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by T. J. Smayda and Y. Shimizu, Elsevier, 1992, in press.
- 32) Y. Ishida, C. H. Kim & Y. Sako : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by T. J. Smayda and Y. Shimizu, Elsevier, 1992, in press.
- 33) C. H. Kim, Y. Sako & Y. Ishida : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 投稿中.
- 34) Y. Oshima, T. Hayagawa, M. Hashimoto, Y. Kotaki & T. Yasumoto : *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 851 (1982).
- 35) L. Maranda, D. M. Anderson & Y. Shimizu : *Est. Cost. Shelf. Sci.*, **21**, 401 (1985).
- 36) A. D. Cembella & F. J. R. Taylor : *Biochem. Syst. Ecol.*, **15**, 171 (1987).
- 37) Y. Oshima, K. Sugino, H. Itakura, M. Hirota & T. Yasumoto : "Toxic Marine Phytoplankton", ed. by E. Graneli *et al.*, Elsevier, 1990, p. 391.
- 38) Y. Sako, C. H. Kim & Y. Ishida : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 692 (1992).
- 39) C. H. Kim, Y. Sako & Y. Ishida : 投稿準備中.