英真湾から分離された海洋細菌 AA8-2 株の *Heterocapsa circularisquama* に対する殺藻性に関する検討

長崎 慶三, 山口 峰生, 今井 一郎

(1999 年 9 月 22 日受付, 2000 年 2 月 10 日受理)

Algicidal Activity of a Killer Bacterium against the Harmful Red Tide
Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* Isolated from Ago Bay, Japan

Keizo Nagasaki,*¹ Mineo Yamaguchi,*¹ and Ichiro Imai*²

Algicidal activity of a bacterium strain *Cytophaga* sp. AA8-2 against the harmful red tide causing alga *Heterocapsa circularisquama* was investigated. Physiological conditions of host cells, incubation temperature and existence of ambient organic substrates or co-existing bacteria affected the lethal effect of *Cytophaga* sp. AA8-2. Bacterial lysis of *H. circularisquama* was caused more rapidly at higher incubation temperature (20–30°C). Growth of 6 among 7 *H. circularisquama* strains tested was inhibited by *Cytophaga* sp. AA8-2, the levels of which were varied. A part of *H. circularisquama* cells in a culture formed temporary cysts to survive the bacterial attack. The envelope of the temporary cyst of *H. circularisquama* was composed of a markedly thicker layered structure (209±72 nm) than that of the vegetative cell (40±15 nm).

キーワード：赤潮, *Heterocapsa circularisquama*, 細菌, テンボラリーシスト, *Cytophaga* 属

近年, 西日本沿岸域を中心に, 二枚貝のみをへい死させる性質を持つ新しいタイプの赤潮が頻発するようになった。この赤潮の原因生物である *Heterocapsa circularisquama*¹⁾ は, 渦鞭毛藻の一種であり, これまでのところ日本以外ではその存在が確認されていない。²⁾ 1988 年に初めて本藻による赤潮が高知県浦ノ内湾で発生して以来, 1997 年までに西日本沿岸域の少なくとも 15 カ所でその発生が確認されており,³⁾ なかでも 1992 年の英真湾でのアコヤガイ養殖に対する被害,⁴⁾ 1994 年の楠浦湾でのアコヤガイ・マガキ・アサリへの被害, ならびに 1995,⁵⁾ 1997 および 1998 年の広島湾での養殖カキ・アサリへの被害等は, それぞれ数億~数十億円単位の損失をもたらし,²⁾ 本藻による赤潮が二枚貝の養殖に対して重大な脅威となることを世に知らしめた。*H. circularisquama* の生活史はまだ十分に解明されていないものの, 西日本各地での *H. circularisquama* 赤潮の発生は, 本種がその分布域を確実に広げつつあることを如実に示している。³⁾ また, 本種が, 球形~楕円形の細胞(テンボラリーシスト)⁶⁾ となることで, 養殖貝の陸上輸送

を経由してなお生残し, その分布域を各地の二枚貝養殖の場へと拡大している可能性も指摘されている。⁷⁾ これまでに *H. circularisquama* によるへい死が報告されている二枚貝には, カキ・アコヤガイ・アサリなど水産業上重要な位置を占める生物種が多く含まれており, *H. circularisquama* 赤潮に対する方策(発生域拡大防止・予察・防除手法)の確立, なかでも *H. circularisquama* 赤潮の防除を目的とした研究の推進が強く望まれている。

さて近年, 従来型赤潮の原因種である *Gymnodinium mikimotoi*・*Chattonella antiqua* ならびに *Heterosigma akashiwo* 等に対する殺藻細菌に関するデータが蓄積され, 赤潮の発生から消滅までのメカニズムを司る要因の一つとしてこれらの微生物が及ぼす影響が重要視されるようになった。⁸⁻¹¹⁾ また最近では, *H. akashiwo* に対して特異的な殺藻能を持つウイルスに関する研究¹²⁻¹⁶⁾ も進められており, ウイルスの赤潮防除用生物農薬としての使用を視野に入れた検討がなされているところである。¹⁶⁾ このように, もともと天然環境中に存在する微生物を利用した赤潮防除技術の開発研究は, 環境にやさし

*¹ 水産庁瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部赤潮生物研究室 (Harmful Phytoplankton Section, Harmful Algal Bloom Division, National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan).

*² 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋環境微生物学分野 (Laboratory of Marine Environmental Microbiology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyou, Kyoto 606-8502, Japan).

い赤潮対策の確立に繋がるものとして、大きな期待が寄せられている。¹⁶⁻¹⁸⁾ 本研究分野のさらなる推進を図るためには、環境中に存在する有害微細藻に対する攻撃能を持つ微生物の探索を進めるとともに、十分な性状解析に基づき応用の可能性を吟味することが必要である。

こうした背景の下、今井ら¹⁹⁾は *H. circularisquama* を殺滅する海洋細菌 *Cytophaga* sp. AA8-2 株²⁰⁾ を三重県英虞湾より分離し、その攻撃特異性、接種密度による増殖抑制能の差、ならびに免疫化学的性状について報告した。今井ら¹⁹⁾によれば、AA8-2 株の殺藻特異性は低く、*G. mikimotoi*, *C. antiqua* ならびに *H. akashiwo* 等の従来型赤潮原因種を含む無殻のプランクトンに対して広く増殖抑制作用を示すが、同株は高密度に増殖した *H. circularisquama* を殺滅する能力を持つことから、将来的に *H. circularisquama* 赤潮防除のための生物農薬としての応用の可能性を有するものと期待される。しかしながら、開放系である海に対して生物農薬を散布投与する以前に、その生物の基本的性状を室内実験系で十分に検討しておく必要がある。本研究では、培養温度、藻体側の増殖段階等について種々の実験条件を設定し、それぞれの条件下における AA8-2 株の *H. circularisquama* に対する殺藻性について検討を行った。

実験方法

使用生物と培養法 本実験に使用した *Heterocapsa circularisquama* クローン株のリストを Table 1 に示した。天然環境中には藻体内細菌を持つ *H. circularisquama* 個体のごく普通に存在しており、^{1,19)} 本実験に供試した *H. circularisquama* 株のうち厳密な意味で無菌株といえるものは 1 株のみ (HU9433-P) であった。本株は、細胞内細菌を含む細胞と細胞内細菌を持たない細胞とが混在する *H. circularisquama* クローン培養中からマイクロキャピラリーにより単離・選択した無菌クローンであり、DAPI 染色および透過型電子顕微鏡観察により藻体細胞

内が無菌状態であることが確認されている (未発表)。他の *H. circularisquama* 株についても DAPI 染色もしくは常法²¹⁾による透過型電子顕微鏡観察を行い、細胞内細菌の有無を判定した (Table 1)。*H. circularisquama* の培養温度は原則的に 25°C とし、光強度 45 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ の蛍光灯光を 14 時間明 10 時間暗のサイクルで照射した。培養には Na_2SeO_3 を終濃度 2 nM となるように添加した改変 SWM-3^{22,23)}を使用した。

殺藻細菌 AA8-2 株の保存培養には ST10-1 培地²⁴⁾を使用し、培養温度は 25°C とした。本実験の目的が殺藻性に関する検討であるという点を考慮し、接種実験には、無菌培養株である *H. circularisquama* HU9433-P 株に対して AA8-2 株を接種して得られた溶藻液を GF/F フィルターで濾過して藻体細胞 (テンポラリーシスト) を除去して得られた AA8-2 菌体懸濁液を接種源として用いた。菌体の計数は、ST10-1 培地を用いた寒天培地平板法により行った。本実験における GF/F 濾液中の菌体密度は $4.7 \times 10^7 \sim 4.9 \times 10^8/\text{ml}$ であった。

***H. circularisquama* の増殖段階による AA8-2 株の殺藻性の差** AA8-2 株による殺藻作用が *H. circularisquama* の増殖段階によってどのように異なるかを調べるため、以下の実験を行った。*H. circularisquama* HA92-1 および HY9423 を、上記条件下で培養した。藻体の増殖は蛍光光度計 (モデル 10-005R, Turner Design 社製) を用い相対蛍光値として測定した。蛍光値の変化から藻体培養が対数増殖期後期および定常期に達したと判断された時点で AA8-2 株を接種した後、継続して藻体の増殖を測定した。実験はいずれも 3 本立てで行った。また、対照として AA8-2 株非接種区を設けた。

AA8-2 株の殺藻性に対する有機物の影響 環境中に殺滅藻体細胞以外の利用可能な有機物 (トリプチケースペプトンおよび酵母抽出物) が存在する場合としない場合とで、*H. circularisquama* に対する AA8-2 株の殺藻

Table 1. *Heterocapsa circularisquama* strains used in the present study

Strains	Isolation	Bacterial contamination	Intracellular bacteria*
<i>Heterocapsa circularisquama</i> HA92-1	Ago Bay (Dec. 1992)	—	+
<i>H. circularisquama</i> HY9423	Yatsushiro Kai (Sep. 1994)	—	+
<i>H. circularisquama</i> HI9428	Imari Bay (Sep. 1994)	—	+
<i>H. circularisquama</i> HU9436	Uranouchi Bay (Dec. 1994)	—	+
<i>H. circularisquama</i> HU9433-P	Uranouchi Bay (Dec. 1994)	—	—
<i>H. circularisquama</i> HH N24-3	Hiroshima Bay (Nov. 1995)	+	n.t.**
<i>H. circularisquama</i> HO-2	Obama Bay (Sep. 1997)	+	+

* Based on transmission electron microscopy or fluorescence microscopy. ** Not tested.

作用がどのように変化するかを調べるため, 以下の実験を行った。実験には *H. circularisquama* HA92-1 および HY9423 を用いた。培養条件ならびに藻体の増殖の測定法は上記と同様である。各株の対数増殖期後期に, 有機物添加区では ST10⁻¹ 培地 (トリプチケースペプトン = 500 µg/ml, 酵母抽出物 = 50 µg/ml) を, 有機物非添加区では滅菌海水をそれぞれ終濃度 20% (v/v) となるよう添加し, さらに相対蛍光値の変化から藻体培養が定常期に達したと判断された時点で AA8-2 株を接種した。実験はいずれも 3 本立てで行った。また, 対照として両区に AA8-2 株非接種区を設けた。

AA8-2 株の殺藻作用に及ぼす温度の影響 AA8-2 株による殺藻作用が, 培養温度によってどのように異なるかを調べるため, 以下の実験を行った。*H. circularisquama* HA92-1 を, 改変 SWM-3 を用いて, 15・20・25 および 30°C の 4 温度段階でそれぞれ 3 日間馴致培養し, 対数増殖期後期に至った段階で, 各温度で 1 週間馴致した AA8-2 株をそれぞれ接種した。光条件ならびに藻体増殖のモニタリング法は上記と同様である。実験はいずれも 3 本立てで行い, 対照として全温度区に AA8-2 株非接種区を設けた。

異なる *H. circularisquama* 株に対する AA8-2 株の殺藻性 分離場所の異なる *H. circularisquama* 株に対する AA8-2 株の殺藻性がどのように異なるかを, 以下の方法で検討した。実験には, *H. circularisquama* HY9423・HI9428・HH N24-3・HO-2・HU9436 および HU9433-P の 6 株を用いた (Table 1)。各株とも対数増殖期後期の藻体培養に AA8-2 株を接種した。培養条件ならびに藻体増殖のモニタリング法は上記と同様である。実験はいずれも 3 本立てで行い, 対照として AA8-2 株非接種区をそれぞれ設けた。

このうち, *H. circularisquama* HU9433-P については, AA8-2 株接種前および接種後 12 日目の細胞を常法²¹⁾により透過型電子顕微鏡で観察し, その形態学的差異について検討した。とくに, *H. circularisquama* 細胞表面の微細構造に注目した。

***H. circularisquama* HO-2 株に混在する細菌が AA8-2 株の殺藻性に与える影響** *H. circularisquama* HO-2 の培養液を ST10⁻¹ 寒天培地上に塗抹し, 25°C で 3 日間培養後, 生じたコロニーのうち明らかに形態の異なるものを釣菌し, 培養液中に混在する 3 株の細菌株を得た。各細菌株を ST10⁻¹ 液体培地中にて 25°C で 2 日間培養後, *H. circularisquama* HU9433-P の培養にそれぞれ接種し, これらの細菌が AA8-2 株の殺藻性に及ぼす影響を測定した。光条件ならびに藻体増殖のモニタリング法は上記と同様である。また, 対照区として共存細菌非接種区ならびに AA8-2 株非接種区を設け,

上記と同様の培養条件下で相対蛍光値の測定を行った。

結 果

対数増殖期後期および定常期の *Heterocapsa circularisquama* 培養に対する殺藻細菌 AA8-2 株の殺藻性を比較した結果を Fig. 1 に示した。本実験における AA8-2 株の接種密度は 9.1×10^5 /ml であった。実験に供した *H. circularisquama* HA92-1 および HY9423 は, いずれの増殖段階において菌体接種を受けた場合にも, 接種直後に蛍光値の急減を示した。しかしながら, いずれの実験区においても, 定常期培養より対数増殖期培養の方が AA8-2 株を接種された際の蛍光値の減少幅が大きかった。また, 蛍光値の減少後に観察された生残細胞のほとんどは不動の球形または楕円形細胞であった。これらの細胞は, 洗浄除菌後, 新鮮な改変 SWM-3 培地に移すことで栄養細胞の形状に戻り, 分裂・遊泳能力を回復したことから, テンポラリーシストであると判定した。⁶⁾

有機物の存在下および非存在下での *H. circularisquama*

Fig. 1. Algicidal effects of *Cytophaga* sp. AA8-2 on the growth of *Heterocapsa circularisquama* HA92-1 (A, B) and HY9423 (C, D), where AA8-2 was inoculated at an exponentially growth phase (B, D) or a stationary phase (A, C) of *H. circularisquama* (●).

Arrows indicate bacterial inoculation. As control experiments, growth of *H. circularisquama* without bacterial inoculation (○) is also indicated, respectively. Bars indicate standard deviation.

Fig. 2. Algicidal effects of *Cytophaga* sp. AA8-2 on the growth of *Heterocapsa circularisquama* HA92-1 and HY9423 with (▲) or without ST10⁻¹ (●).

Arrows indicate bacterial inoculation. As a control experiment, growth of *H. circularisquama* without bacterial inoculation (△, ○) was also indicated, respectively. Bars indicate standard deviation.

ma に対する AA8-2 株の殺藻性を比較した結果を Fig. 2 に示した。本実験における AA8-2 株の接種密度は $2.3 \times 10^6/\text{ml}$ であった。実験に供した *H. circularisquama* HA92-1 および HY9423 は、海洋細菌用培地 ST10⁻¹ 添加の有無に関わらず、AA8-2 株の接種後、蛍光値の低下を示した。しかしながらいずれの場合にも、有機物添加区における蛍光値の減少幅は有機物非添加区のそれに比べて小さかった。この実験でも AA8-2 接種区において蛍光値の減少後にテンポラリーシストが確認された。

AA8-2 株の殺藻作用に温度が及ぼす影響を検討した結果を Fig. 3 に示した。15・20・25 および 30℃ の各温度段階における AA8-2 株の接種密度はそれぞれ 5.4×10^5 ・ 6.4×10^5 ・ 4.4×10^5 および $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ であった。本実験で設定したいずれの温度域においても AA8-2 株による *H. circularisquama* HA92-1 に対する殺藻作用は確認され、高温域でより速やかに蛍光値が減少する傾向がみられた。この実験でも AA8-2 接種区において蛍光値の減少後にテンポラリーシストが確認された。しかしながら、本実験結果から、増殖阻害の程度に温度が及ぼす影響が、細菌側・藻体側のいずれに起因するのかを判定することはできなかった。

Fig. 3. Algicidal effects of *Cytophaga* sp. AA8-2 on the growth of *Heterocapsa circularisquama* HA92-1 at 15, 20, 25 and 30°C (●).

Arrows indicate bacterial inoculation. As a control experiment, growth of *H. circularisquama* without bacterial inoculation (○) was also indicated, respectively. Bars indicate standard deviation.

分離場所の異なる *H. circularisquama* 6 株に対する AA8-2 株の殺藻性を比較した結果を Fig. 4 に示した。本実験における AA8-2 株の接種密度は $2.1 \times 10^6/\text{ml}$ であった。本実験に供した 6 株のうち 5 株については、AA8-2 株による殺藻作用が確認された。殺藻の程度は株間で異なり、いずれも本菌株の分離の際に被検藻体株として供試¹⁹⁾された HA92-1 に対するそれと比べると低かった (Fig. 3 の 25℃ 区を参照)。本実験に供した 6 株のうち HO-2 株のみは AA8-2 株による増殖阻害を受けなかった。この理由を明らかにするため、HO-2 培養液に混在する細菌が AA8-2 株の殺藻作用に及ぼす影響を測定した結果、分離された 3 株の細菌株のうちの 1 株が *H. circularisquama* HU9433-P に対する AA8-2 株の殺藻性を低減する作用を示した (Fig. 5)。

H. circularisquama HU9433-P の AA8-2 株接種前および接種後 12 日目の細胞を透過型電子顕微鏡観察により比較した結果、接種後 12 日目に生残していたテンポラリーシストの表層には、非接種区の細胞にはみられない (Fig. 6A, B) 層状構造が発達していることが明らかとなった (Fig. 6C, D)。非接種区の細胞表層の厚さは $40 \pm 15 \text{ nm}$ ($n=20$) であったのに対し、接種後 12 日目の細胞表層の厚さは $209 \pm 72 \text{ nm}$ ($n=20$) と、後者に

Fig. 4. Algicidal effects of *Cytophaga* sp. AA8-2 on the growth of *Heterocapsa circularisquama* HY9423, HI9428, HH N24-3, HO-2, HU9436 and HU9433-P (●).

Arrows indicate bacterial inoculation. As a control experiment, growth of *H. circularisquama* strains without bacterial inoculation was also indicated (○), respectively. Bars indicate standard deviation.

おける明瞭な肥厚現象が観察された。

考 察

AA8-2 株の *Heterocapsa circularisquama* に対する殺藻の程度は、藻体側の増殖段階により異なった (Fig. 1)。同様の事例は、過去に *Gymnodinium nagasakiense* に対する殺藻細菌株の性状に関する研究でも報告されている。⁸⁾ 本実験では藻体の生物量を相対蛍光値で測定したが、顕微鏡観察の結果から、蛍光値の差は生残したテンポラリーシストの量を反映していると考えられた。すなわち本実験の結果は、定常期の細胞が対数増殖期の細胞よりもテンポラリーシストになりやすい生理的状态にあるという可能性を示している。この現象については、今後さらに定量性の高い実験系により検証する必要がある。

一般に、定常期の細胞は対数増殖期の細胞とは異なる

Fig. 5. Growth of *Heterocapsa circularisquama* HU9433-P inoculated (arrows) with the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. AA8-2 (●) or without inoculation of AA8-2 (○).

Three bacterial strains isolated from *H. circularisquama* HO-2 culture were also inoculated independently (arrows) in the experiments A, B, and C. No bacterial strain isolated from *H. circularisquama* HO-2 culture was inoculated in the experiment D. Bars indicate standard deviation. Note the suppression of algicidal activity of AA8-2 in experiment B.

化学組成を持ち、熱、寒冷、放射線あるいは化学因子といった外的ストレスに対して高い抵抗性を示すことが知られているが、²⁵⁾ *H. circularisquama* のテンポラリーシスト形成がこのような現象と相同であるかどうかについては今後の研究を待たねばならない。Uchida *et al.*⁶⁾ ならびに内田²⁶⁾ は、テンポラリーシストの生態学的役割を一時的な環境条件の変化に対する適応戦略ならびに現場環境中での底生期細胞としての生残戦略として解釈し、また、Honjo *et al.*⁷⁾ は、貝殻内での *H. circularisquama* の生残にテンポラリーシスト化が重要な意味合いを持つことを明確に指摘した。さらに英虞湾においてマイクロプレート MPN 法による *H. circularisquama* 殺藻性微生物の探索計数が実施されたが、殺藻微生物の存在を示す実験結果が得られた場合でも本藻は完全に死滅せず、ほとんどの細胞がテンポラリーシストの状態を観察された。²⁷⁾ 各研究グループにより観察された球形～楕円形の *H. circularisquama* 細胞は、「テンポラリーシスト」という共通の用語で表現されている。しかしながら、異なる条件下で生じたこれらの不動の球形～楕円形細胞が生理学的に同一の性質を持ったものかどうかについては

Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Heterocapsa circularisquama* HU9433-P.

Note that the thick envelope structure is observed in a temporary cyst (C and D) but in a vegetative cell (A and B); N, a nucleus; S, a starch grain; CH, a chloroplast.

今後の研究を待たねばならない。いずれにしてもテンポラリーシストの生態学的意義の解明は、*H. circularisquama* の生存戦略を理解する上で不可欠であり、そのためには種々の環境条件下でのテンポラリーシスト形成のメカニズムおよびその耐久能力を明らかにする必要がある。

AA8-2 株による *H. circularisquama* に対する殺藻の程度は、培地中の有機物の有無によっても影響された。すなわち海洋細菌培養用の ST10-1 培地に含まれる有機成分であるトリブチケースベプトンおよび酵母抽出物の存在下で、AA8-2 株の殺藻効果は緩和された (Fig. 2)。この結果は、二者培養系で *H. circularisquama* 細胞に対して高い資化能を示すように見受けられる AA8-2 株が、必ずしも *H. circularisquama* 構成成分に対して特異的な嗜好性を持つわけではなく、より急速に代謝されるエネルギー源が存在する環境下ではその物質を利用

し、その結果として *H. circularisquama* への殺藻性が低減したことを示しているものと考えられる。

AA8-2 株の赤潮に対する生物利用農薬的な応用の可能性を考えた場合、標的となる *H. circularisquama* 細胞が環境中に存在するしないに関わらず増殖可能である点、ならびに広温度域での増殖および殺藻性の発揮が可能である (Fig. 3) という点は、現場での AA8-2 株の高い増殖力、ひいては *H. circularisquama* に対する高殺藻圧の維持を期待させる反面、現場散布後の菌体の量的制御が難しいという点で、こうした手法の現場での実用化の難しさを示すものである。また、本菌株は多種の藻体に対して殺藻性を発揮する¹⁹⁾ことから、現場への応用の可能性を模索するには、AA8-2 株の生理生態学的特性に関するさらに詳細な研究を通しその安全性を検討するとともに、本研究等を通して得られた使用生物の性状に関する基礎データに基づく現場モデル系での散布実

験を通して, より現実的な検証を行う必要があろう。

分離場所の異なる *H. circularisquama* 株に対する AA8-2 株の殺藻性を比較した結果, AA8-2 株は実験に供した *H. circularisquama* 7 株のうち 6 株に対して殺藻性を示したが, その殺藻の程度は株間で異なった (Fig. 4)。この実験を含め, AA8-2 株による殺藻がみられたすべての実験区では, いずれも蛍光値は一旦減少したものの, その後はほぼ一定の値に保たれた。その際, 直接検鏡により, 生残したテンポラリーシストが多数観察されたことから, 大部分の藻体細胞の死滅と一部の細胞のテンポラリーシスト化による生残が蛍光値の変化に反映されたものと解釈できる。また, 株間で殺藻細菌 AA8-2 株への耐性に差がみられた理由としては, テンポラリーシストに変化した細胞の割合の差と, テンポラリーシストそのものの AA8-2 株への抵抗性の差が考えられる。

HO-2 株の AA8-2 株にする抵抗性には共存細菌の作用が関与している可能性が示唆されたが (Fig. 5), この結果から, 藻体との二者培養系で発揮される殺藻作用が, 他の細菌が共存する環境下で阻害される場合があるものと推察された。この現象が共存細菌からのいかなる作用によって生じたか, また藻体側・殺藻細菌側のいずれに対して作用したかは明らかでないが, 多種多様な細菌が存在する現場環境中で殺藻細菌が *H. circularisquama* に対して与える影響を客観的に評価するには, 単純な二者培養系での実験結果にのみ基づくことなく, 種々の生物因子の影響を総合的に加味する必要があるといえよう。

AA8-2 株接種によって誘導された *H. circularisquama* HU9433-P のテンポラリーシストの表層において明瞭な肥厚現象が観察された (Fig. 6)。この結果は, *H. circularisquama* がテンポラリーシストとなる過程で, 細胞表層で層状マトリックスの生合成を行い, 細胞としての耐久性を高めている可能性を示すものである。定常期細胞の方がテンポラリーシストに変化しやすいことを考慮した場合, テンポラリーシストへの変化の過程で対数増殖期には駆動されない生合成経路が機能している可能性が高い。テンポラリーシスト化を促進・誘導する要因を抽出し, テンポラリーシスト形成時に機能する遺伝子を例えば Differential Display 法²⁸⁾等により探索することで, *H. circularisquama* のテンポラリーシスト形成のメカニズムを明らかにすることが可能となるものと期待される。

謝 辞

Heterocapsa circularisquama のクローン培養を分譲していただいた水産庁瀬戸内海区水産研究所の内田卓志博

士, 松山幸彦氏ならびに京都大学大学院農学研究科の牧輝弥氏に深甚なる感謝の意を表します。本研究は, 環境庁の国立機関公害防止等試験研究費「渦鞭毛藻・ラフィド藻による新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究」ならびに水産庁赤潮対策事業の海洋微生物活用技術試験研究費に依った。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) T. Horiguchi: *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.*, **43**, 129-136 (1995).
- 2) 玉井恭一: 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* をめぐる研究と問題点 赤潮発生と被害の現状. 日本プランクトン学会報, **46**, 153-154 (1999).
- 3) 本城凡夫, 松山幸彦: 貝類養殖業を脅かすヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ赤潮 発生状況と被害. 瀬戸内海, **14**, 2-7 (1998).
- 4) 松山幸彦, 永井清仁, 水口忠久, 藤原正嗣, 石村美佐, 山口峰生, 内田卓志, 本城凡夫: 1992 年に英虞湾において発生した *Heterocapsa* sp. 赤潮発生期の環境特性とアコヤガイ斃死の特徴について. 日本水誌, **61**, 35-41 (1995).
- 5) 松山幸彦, 木村 淳, 藤井 斉, 高山晴義, 内田卓志: 1995 年広島湾西部で発生した *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生状況と漁業被害の概要. 南西水研報, **30**, 189-207 (1997).
- 6) T. Uchida, S. Toda, Y. Matsuyama, M. Yamaguchi, Y. Kotani, and T. Honjo: Interactions between the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **241**, 285-299 (1999).
- 7) T. Honjo, N. Imada, Y. Oshima, Y. Maema, K. Nagai, Y. Matsuyama, and T. Uchida: Potential transfer of *Heterocapsa circularisquama* with pearl oyster consignments, in "Harmful Algae" (ed. By B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez, and T. Waytt), Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1998, pp. 224-226.
- 8) K. Fukami, A. Yuzawa, T. Nishijima, and Y. Hata: Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1073-1077 (1992).
- 9) I. Imai, Y. Ishida, and Y. Hata: Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**, 527-532 (1993).
- 10) M. C. Kim, I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura, A. Uchida, and Y. Ishida: A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **170**, 25-32 (1998).
- 11) K. Fukami, K. Sakaguchi, M. Kanou, and T. Nishijima: Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from *Skeletonema costatum* to *Heterosigma akashiwo*. in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. By T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996, 1998, pp. 335-338.
- 12) K. Nagasaki and M. Yamaguchi: Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga, *Heterosigma akashiwo*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **13**, 135-140 (1997).
- 13) K. Nagasaki and M. Yamaguchi: Intra-species host

- specificity of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus) clones. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**, 109–112 (1998).
- 14) K. Nagasaki and M. Yamaguchi: Effect of temperature on the algicidal activity and the stability of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus). *Aquat. Microb. Ecol.*, **15**, 211–216 (1998).
 - 15) K. Nagasaki, K. Tarutani, and M. Yamaguchi: Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 898–902 (1999).
 - 16) 長崎慶三：殺藻性ウイルスによる赤潮防除の可能性. *Microb. Environ.*, **13**, 109–113 (1998).
 - 17) 石田祐三郎：赤潮藻の微生物学的防除に関する現状と将来. 赤潮と微生物-環境にやさしい微生物農薬を求めて, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9–21 (1994).
 - 18) 今井一郎：赤潮の生物的防除の可能性. 日本海水学会誌, **52**, 216–227 (1998).
 - 19) 今井一郎, 中桐 栄, 牧 輝弥: *Heterocapsa circularisquama* と海洋細菌との関係. 日本プランクトン学会報, **46**, 172–177 (1999).
 - 20) R. Kondo, I. Imai, K. Fukami, A. Minami, and S. Hiroishi: Phylogenetic analysis of algicidal bacteria (Family *Flavobacteriaceae*) and selective detection by PCR using a specific primer set. *Fisheries Sci.*, **65**, 432–435 (1999).
 - 21) Y. Hara and M. Chihara: Ultrastructure and taxonomy of *Chattonella* (Class *Raphidophyceae*) in Japan. *Jap. J. Phycol.*, **30**, 47–56 (1982).
 - 22) L. C. M. Chen, T. Edelstein, and J. McLachlan: *Bonnemaia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211–220 (1969).
 - 23) 伊藤克彦, 今井一郎：ラフィド藻. 赤潮生物研究指針, 秀和, 東京, pp. 122–130 (1987).
 - 24) Y. Ishida, M. Eguchi, and H. Kadota: Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**, 197–203 (1986).
 - 25) R. Y. Stanier, E. A. Adelberg, J. L. Ingraham, and M. L. Wheelis: 微生物学 入門編. 培風館, 東京, 444 p. (1980).
 - 26) 内田卓志：有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* をめぐる研究と問題点 *Heterocapsa circularisquama* の生活史および生態的特徴. 日本プランクトン学会報, **46**, 169–170 (1999).
 - 27) 今井一郎, 中桐 栄, 永井清仁, 長崎慶三, 板倉 茂, 山口峰生：夏季の英虞湾における有害赤潮渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 殺藻微生物の変動. 南西水研研報, **31**, 53–61 (1998).
 - 28) 尾崎浩一, 中村祐輔：ディファレンシャル mRNA ディスプレイ法による組織特異的遺伝子の単離とその意義. 蛋白質・核酸・酵素, **42**, 2869–2875 (1997).