

ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* および *Chattonella antiqua* の培養ろ液が珪藻 *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響

松山 幸彦・内田 卓志・小谷 祐一

Effect of Culture Filtrate of Raphidophytes *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* on the Growth of Diatom *Skeletonema costatum*

Yukihiko Matsuyama, Takuji Uchida, and Yuichi Kotani

Abstract Effects of culture filtrates of two raphidophytes *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* on the growth of diatom *Skeletonema costatum* were examined under the axenic condition. Cell-free filtrate of both raphidophytes at late logarithmic phase markedly suppressed the growth of *S. costatum* in nutrients-enriched conditions. The results clearly indicated that both filtrates had allelopathic effects on *S. costatum* mediated by growth suppressor released by the two raphidophytes. The growth suppressor in filtrate were not inactivated when the medium was subjected in heat bath (80°C) for 60 min, and were low molecular weight (M.W. < 3,000). Further, growth suppressor were absorbed to Sep-pak C₁₈ column but not XAD-4, and inactivated by ether rinses under the acidic (pH 3.2) condition. These results suggested that the growth suppressor in culture filtrates of both raphidophytes are probably lipid such as fatty acids.

Key words: *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella antiqua*, raphidophyte, growth suppression, *Skeletonema costatum*, filtrate

赤潮とは一般的に特定の生物（主に植物プランクトン）が海水の着色を伴うまで異常増殖することを呼ぶ。通常の海域では、珪藻や鞭毛藻など多種多様な生物群がお互いに競合しつつ、全体として多様性の高い生物相を形成している。しかし、赤潮の場合は特定の1種あるいは数種の生物が他の生物群を凌駕して増殖し、ついには水柱を独占してしまう。こうした特定の生物が異常増殖して赤潮を形成するためには、水温、塩分、光、海水流動といった物理的環境が増殖に好適な範囲にあることと同時に、増殖に必要な栄養塩が河川や底層から十分に供給されることが必要であると言われる（飯塚・入江 1972）。さらに、同じ栄養塩を利用して増殖する他の植物プランクトンとの栄養塩をめぐる競合にうち勝ち、海域に溶存する栄養塩を独占的に利用することも、赤潮形成には重要な要因である。

大規模な赤潮を形成し、甚大な漁業被害を引き起こす

生物群には、ラフィド藻や渦鞭毛藻といった鞭毛藻類が多く含まれる。鞭毛藻類は最大の栄養競合者である珪藻類との競争にうち勝つために、様々な機能を備えている。それらのうち、最も有効なのは遊泳能力である。鞭毛藻の遊泳能力は1 m/hを越えることもあり（Kamykowski *et al.* 1998, Koizumi *et al.* 1996）、成層時などの鉛直的な海水の混合が弱い時期でも、日周鉛直移動を行うことで珪藻類が利用できない下層に豊富に含まれる栄養物質を利用できる（Eppley *et al.* 1968, Koizumi *et al.* 1996）。また、その細胞外壁がセルロース質の鎧版、膠質の皮膜、あるいは多糖類の細胞外マトリックス（glycocalyx）などの有機物質で形成されており、珪酸塩を栄養源として必要としない。このことは、陸水と比較して珪酸塩濃度が著しく低い海水中で、珪藻類と競合するうえで非常に有効であると言える。さらに、栄養競合者である珪藻類や他の藻類などを直接栄養源として利用する従属栄養渦

2000年2月21日受理 (Accepted on February 21, 2000)

瀬戸内海区水産研究所業績A第11号 (Contribution No. A 11 from National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea)
松山幸彦・内田卓志・小谷祐一：瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (Y. Matsuyama, T. Uchida, and Y. Kotani: National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

鞭毛藻 (Heterotrophic dinoflagellate) や、光合成を行いつつ同時に珪藻類などの捕食も行うという混合栄養 (mixotroph) の鞭毛藻も知られている (Gaines and Elbrächter 1987)。

このように、鞭毛藻が珪藻類に対抗するために様々な機能を有しているとはいえ、個体群の維持に重要な役割を果たす増殖速度は珪藻類には及ばず、通常の海域では珪藻類が優占することが多い。しかし、一時期とはいえ、なぜ増殖速度の遅い鞭毛藻類が珪藻類を凌駕するまで増殖するのかについては、上述の機能や物理化学的環境要因だけでは説明が難しく、化学的作用で珪藻類を排除する能力が鞭毛藻類に備わっているのではないかと考えられてきた (Rice 1984)。

その一つとして生物が化学物質を分泌して相手の増殖を抑制する作用：アレロパシー (allelopathy, 他感作用) が、鞭毛藻類が珪藻類を排除するのに重要な役割を演じているのではないかと考えられている (Rice 1984)。しかしながら、アレロパシーによって鞭毛藻が珪藻類の増殖を抑制しているかどうかについては実証的な知見が乏しい。過去に行われたアレロパシーに関する研究のほとんどが有菌培養系で行われているため、混在するバクテリアによって細胞外に分泌した物質が分解されて実際の作用を十分に把握できなかつたり、あるいは分解の過程で生じる副産物の影響が含まれていて、アレロパシー作用を示す物質と珪藻類の増殖抑制との因果関係を断定するまでには至っていないのが現状である。今回鞭毛藻の珪藻類に対するアレロパシー作用を明らかにするため、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* と *Chattonella antiqua* の無菌培養からろ液を調製し、これが珪藻 *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響を検討したので報告する。

材料および方法

広島湾における *Heterosigma akashiwo* 赤潮発生時の珪藻類の動態

現場海域におけるラフィド藻類と珪藻類の動態を把握するため、*H. akashiwo* 赤潮発生時の広島湾における植物プランクトン細胞密度の変化について調べた。観測は

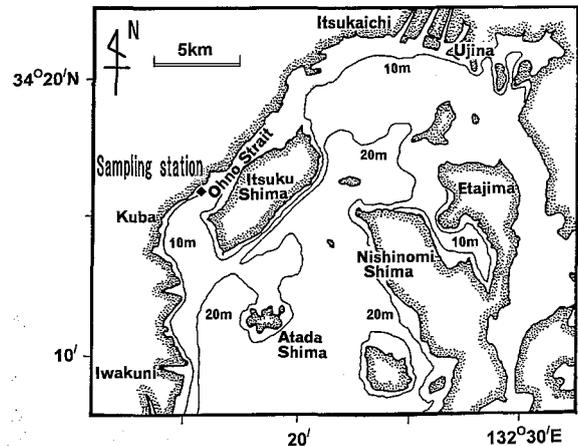


Fig. 1. Location of sampling station (◆).

図1に示した大野瀬戸に位置する1定点で、1992年6月23日から7月2日にかけて7回行った。最高潮位時の前後2時間以内に、ニスキン採水器を用いて試水を採水した。採水層は水深0, 2, 5 mである。1Lの海水を採水後、直ちに室内に持ち帰り、界線入スライドグラス上の海水に含まれるプランクトンを顕微鏡で同定・計数した。細胞密度が1 cell/mlを下回った時には、グラスファイバーフィルター (Whatman社製, GF/C, 孔径1.2 μm) を装着した本城式プランクトン濃縮器で試水を濃縮した後に、同定と計数を行った。なお、本濃縮による珪藻類の回収率は、*Skeletonema costatum* で平均82%、*Chaetoceros* spp. で平均67%であったことから、濃縮試料の計数値については、それぞれを0.82および0.67で除して最終細胞密度を計算した。

ラフィド藻の無菌培養ろ液による *S. costatum* の増殖試験
実験には広島湾から分離された *H. akashiwo* (HS-92) および大阪湾から分離された *Chattonella antiqua* (OC-B5) の無菌培養株を用いた。また、アッセイに供した珪藻 *S. costatum* (SK85W) は、大阪湾から分離された無菌培養株である。培養には改変 SWM3 培地 (伊藤・今井 1987) を用い、水温 22°C, 塩分 31 psu, 12L:12D, 100 μmol/m²/s の条件下で培養を行った (表1)。

Table 1. Preparation of cell-free filtrate of two raphidophytes for *Skeletonema costatum* culture. Culture conditions: 22°C, 31 psu, 12L:12D, 100 μmol/m²/s

	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Chattonella antiqua</i>
Strain name (origin)	HS-92 (Hiroshima Bay)	OC-B5 (Osaka Bay)
Medium	modified SWM3	modified SWM3
Culture periods	14~20 days	14~22 days
Cell density	1.6~2.8×10 ⁵ cells/ml	5.6~7.5×10 ⁴ cells/ml
Centrifugation	720×g, 10 min	720×g, 10 min
Filtration	GF/C (ca. 1 μm)	GF/C (ca. 1 μm)

培養ろ液の調整は、*H. akashiwo* は培養日数が14~20日、細胞密度は $1.6\sim 2.8 \times 10^5$ cells/ml、*C. antiqua* は培養日数が14~22日、細胞密度は $5.6\sim 7.5 \times 10^4$ cells/ml の範囲に達した段階で実施した。また、藻体の破損による細胞内物質の放出を最小限にするため、藻体を遠心分離 ($720 \times g$, 10 min) で沈殿させた後、上澄をグラスファイバーフィルター (GF/C) で常圧ろ過した。ろ液中に含まれる阻害物質の性状を調べるため、得られた培養ろ液に対して以下の7通りの処理を行った。

1) 加熱処理区

実験は *H. akashiwo* と *C. antiqua* の培養ろ液を用いて行った。50 ml のろ液を 100 ml 容の三角フラスコに収容してフラスコの口をパラフィルムで密栓し、80°C に調温されたウォーターバス中で60分間加熱した。

2) 限外ろ過処理区

実験は *H. akashiwo* と *C. antiqua* の培養ろ液を用いて行った。50 ml のろ液を Amicon 社製の限外ろ過膜 (ダイアフローメンブレン, YM3) を装着した攪拌式限外ろ過器 (model 8400) に供して分子量3,000以上の画分を除いた。

3) XAD-4 樹脂処理区

実験は *H. akashiwo* の培養ろ液を用いて行った。疎水性の物質 (特にフェノール関連物質) を吸着する作用のある XAD-4 樹脂 (Putnam and Tang 1986) をカラム (20×100 mm) に充填し、メタノール, 1N-HCl, 再蒸留水の順で洗浄した後、ろ液を通過させた。

4) 弱アルカリ-エーテル処理区

実験は *H. akashiwo* の培養ろ液を用いて行った。50 ml のろ液 (pH 8.8) を、室温 (24°C) で等量のジエチルエーテルで激しく振盪し、5分間静置後上層のエーテルを除いた。この操作を3回繰り返した後、ろ液をガラス製ビーカーに移し、試験管スターラーでエーテル臭がなくなるまで激しく攪拌した (24°C, 約2時間)。

5) 酸性-エーテル処理区

実験は *H. akashiwo* の培養ろ液を用いて行った。ろ液を、1N-HCl で pH 3.2 まで低下させた後、4) と同様の操作を行った。

6) ODS 樹脂処理区

実験は *H. akashiwo* の培養ろ液を用いて行った。低極性の物質を吸着させる作用のある ODS カラム (Sep-pak C₁₈, Millipore 社製) を 20 ml のメタノールおよび蒸留水の順で洗浄した後、1N-HCl で pH 5.4 に調整されたろ液を通過させた。

上述の処理を行ったろ液は、改変 SWM3 培地に準じて栄養塩類, 金属, ビタミンを規定量再添加し, pH を 1N-HCl もしくは 1N-NaOH で pH 7.8 に再調整した。最終的にこれをシリンジフィルター (Millipore 社製, GV, 孔径 0.1 μ m) でろ過滅菌し, 予め滅菌された PP

キャップ付ガラス製試験管 (13 \times 120 mm) に分注した後, *S. costatum* を初期密度 450~1,660 cells/ml になるように接種した。これらの操作はろ液の調製から最大6時間以内に行った。なお, これらの処理そのものが SWM3 培地の増殖能に影響を与えないことを予備試験において確認している。*S. costatum* の生物量は蛍光光度計 (Turner Design 社製, model 110) を用いて *in vivo* 蛍光値 (fluorescence, relative units) を毎日測定した (Brand *et al.* 1980)。蛍光値と *S. costatum* の細胞密度との間には, 図2で示したような強い相関関係が認められることから, 細胞密度の代わりに蛍光値を用いて増殖量を評価した。実験は5本立てで行い, 平均値と標準偏差を算出した。対照区には栄養塩濃度を規定量の2倍に調整した改変 SWM3 培地に接種した区を設定した。なお, 培養ろ液, およびそれを用いた *S. costatum* 増殖試験のいずれも, 実験終了時に培養法による細菌検査 (Provasoli *et al.* 1957) を行い, バクテリアの増殖が認められたものについては除外した。

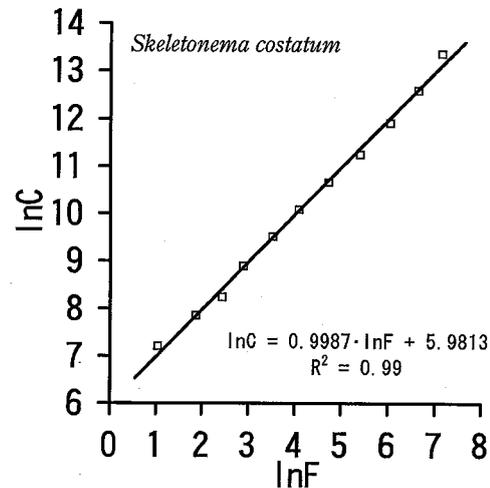


Fig. 2. Correlations between cell density (C; cells/ml) and *in vivo* fluorescence (F; relative units) of diatom *Skeletonema costatum*.

結 果

広島湾における *Heterosigma akashiwo* 赤潮発生時の珪藻類の動態

広島湾における調査時の *H. akashiwo* と主要珪藻類の出現状況を図3に示す。第1回目の採水時点で *H. akashiwo* は 4,300 cells/ml と高密度で出現しており, 海水もやや微着色を呈するなど既に赤潮を形成していた。3日後に細胞密度は急激に増加し, 今回の観測中最も高い細胞密度である 27,400 cells/ml に達した。その後細胞密度は徐々に低下し, ピークから一週間後に最大出現密度の1/100になって赤潮は終息した。

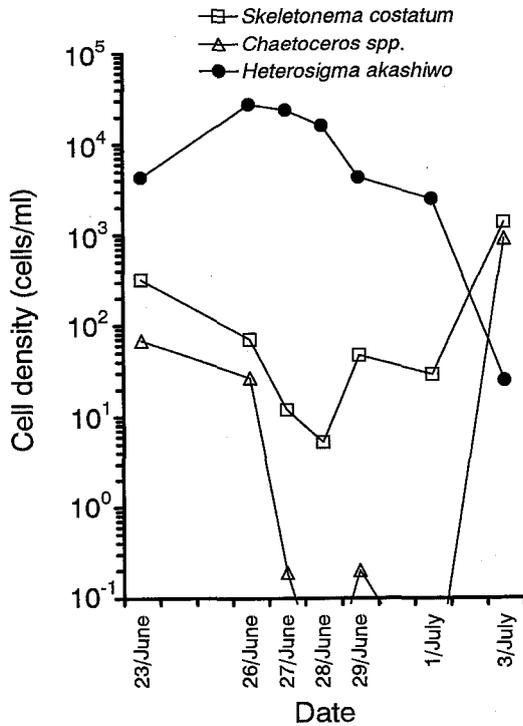


Fig. 3. Temporal changes in cell densities of *Heterosigma akashiwo*, *Skeletonema costatum*, and *Chaetoceros* spp. at sampling station, Hiroshima Bay.

H. akashiwo が 15,000 cells/ml を越えて出現していた期間中の *S. costatum* の細胞密度は 70 cells/ml 以下, *Chaetoceros* spp. は 1 cell/ml 以下といずれも極端に低く推移していた。しかし, *H. akashiwo* の赤潮が終息 (<25 cells/ml) するとこれら珪藻類は急激に増加し, 細胞密度はいずれも 1,000 cells/ml を越えた。なお, この年は *Chattonella* 属の出現が見られなかったため, 現場における珪藻類との出現動態を比較検討することができなかった。

ラフィド藻の無菌培養ろ液による *S. costatum* の増殖試験

図4~7, 表2, 3に, *H. akashiwo* と *C. antiqua* の培養ろ液から再調製された培養液が, *S. costatum* の増殖に及ぼす影響を示した。*S. costatum* 最大細胞密度は, *H. akashiwo* のろ液で対照区の0.7%, *C. antiqua* のろ液で対照区の2.3%に留まっており, いずれの培養ろ液でも *S. costatum* の増殖は強く抑制された。ろ液中の *S. costatum* は死滅することはなかったが, 細胞が非常に小さく, しかも連鎖が歪曲するなどの異常な形態を呈していた。

次に各処理区の *S. costatum* の増殖実験結果について以下に示す。

1) 加熱処理区

最大細胞密度は, *H. akashiwo* の加熱ろ液で対照区の

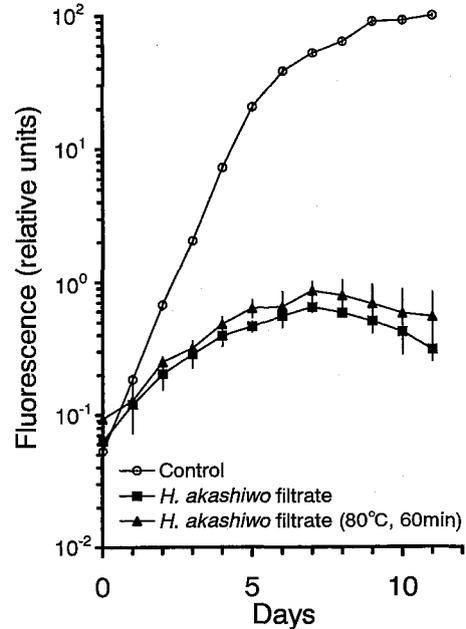


Fig. 4. Growth of *Skeletonema costatum* in nutrients-enriched filtrate of *Heterosigma akashiwo*. Error bars denote standard deviation (\pm S.D.) and closed triangle shows the filtrate after heated with water bath (80°C, 60 min).

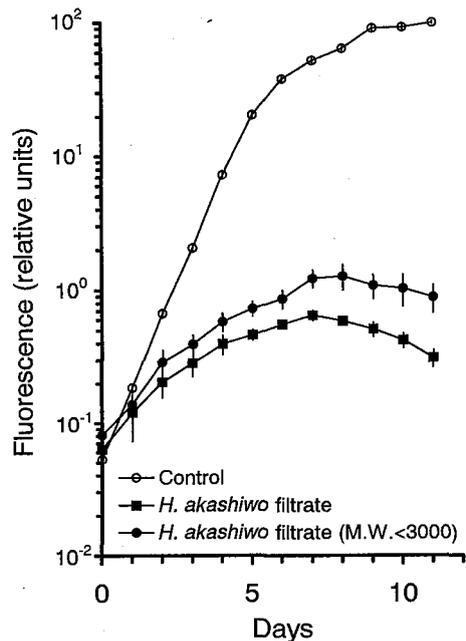


Fig. 5. Growth of *Skeletonema costatum* in nutrients-enriched filtrate of *Heterosigma akashiwo*. Error bars denote standard deviation (\pm S.D.) and closed circle shows the filtrate after ultra-filtration (YM3, Amicon).

0.9%, *C. antiqua* の加熱ろ液で対照区の3.3%に留まっていたことから (図4, 6, 表2, 3), いずれの加熱ろ液でも, *S. costatum* の増殖抑制作用は全く低下しなかった。

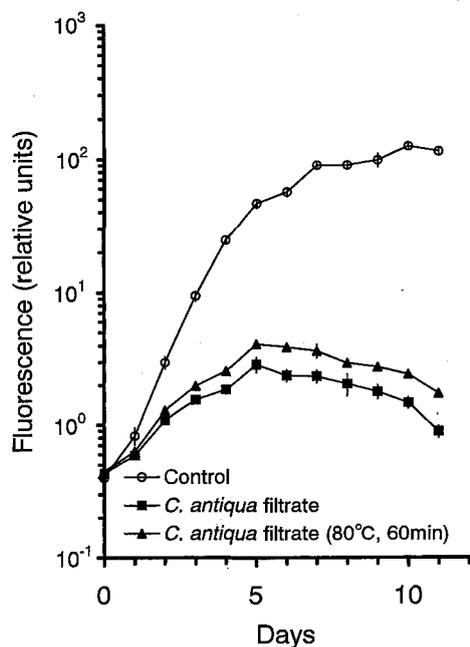


Fig. 6. Growth of *Skeletonema costatum* in nutrients-enriched filtrate of *Chattonella antiqua*. Error bars denote standard deviation (\pm S.D.) and closed triangle shows the filtrate after heated with water bath (80°C, 60 min).

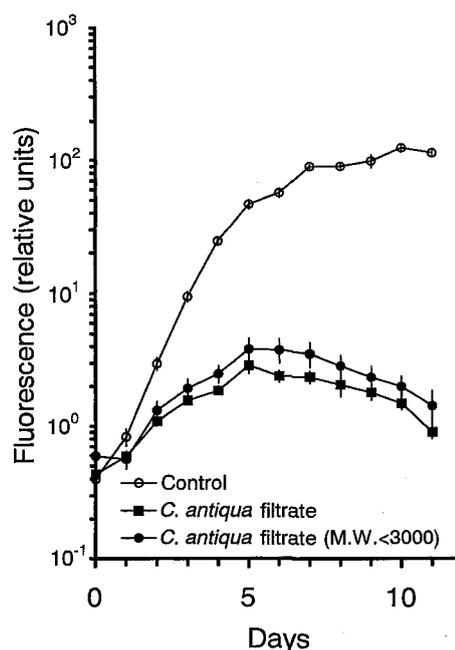


Fig. 7. Growth of *Skeletonema costatum* in nutrients-enriched filtrate of *Chattonella antiqua*. Error bars denote standard deviation (\pm S.D.) and closed circle shows the filtrate after ultra-filtration (YM3, Amicon).

Table 2. Effect of *Heterosigma akashiwo* filtrate on the growth of *Skeletonema costatum*

	Growth of <i>Skeletonema costatum</i> [mean \pm S.D. (n=5)]	
	Maximum yield (fluorescence, relative units)	Growth rate (divisions/day)
Control	97.34 \pm 2.9	1.72 \pm 0.14
Filtrate	0.64 \pm 0.06	0.52 \pm 0.25
Filtrate (80°C, for 60 min)	0.85 \pm 0.14	0.46 \pm 0.26
Filtrate (M.W. < 3,000) * ¹	1.25 \pm 0.27	0.56 \pm 0.26

*¹ 50 ml of filtrate was subjected to ultra-filtration (YM3, Amicon)

Table 3. Effect of *Chattonella antiqua* filtrate on the growth of *Skeletonema costatum*

	Growth of <i>Skeletonema costatum</i> [mean \pm S.D. (n=5)]	
	Maximum yield (fluorescence, relative units)	Growth rate (divisions/day)
Control	122.3 \pm 6.85	1.37 \pm 0.35
Filtrate	2.86 \pm 0.37	0.55 \pm 0.21
Filtrate (80°C, for 60 min)	4.09 \pm 0.22	0.64 \pm 0.22
Filtrate (M.W. < 3,000) * ¹	3.79 \pm 0.78	0.53 \pm 0.42

*¹ 50 ml of filtrate was subjected to ultra-filtration (YM3, Amicon)

2) 限外ろ過処理区

最大細胞密度は、*H. akashiwo* のろ液で対照区の1.3%、*C. antiqua* のろ液で対照区の3.1%に留まっていたことから (図5, 7, 表2, 3), いずれのろ液から分子量

3,000以上の画分を除いても、*S. costatum* に対する増殖抑制作用は全く低下しなかった。

3) XAD-4 樹脂処理区

最大細胞密度は対照区の1.4%に留まっていた (表4)

Table 4. Effects of various treatments on the growth suppression in *Heterosigma akashiwo* filtrate. 50 ml of filtrates were subjected to each treatment

	Growth of <i>Skeletonema costatum</i> [mean±S.D. (n=5)]	
	Maximum yield (fluorescence, relative units)	Growth rate (divisions/day)
Control	134.50±5.30	1.68±0.46
Filtrate	0.91±0.08	0.51±0.30
Filtrate (pass through XAD-4 column)* ¹	1.89±0.14	0.56±0.05
Control	131.00±4.10	1.47±0.56
Filtrate	6.90±0.56	0.37±0.15
Filtrate (rinsed with ether at pH=8.3)* ²	1.45±0.14	0.44±0.19
Filtrate (rinsed with ether at pH=3.2)* ²	83.70±6.32	1.15±0.34
Control	140.10±4.00	1.62±0.49
Filtrate	0.91±0.08	0.51±0.31
Filtrate (pass through C ₁₈ cartridge)* ³	80.98±18.50	1.52±0.60

*¹ Filtrate was passed through XAD-4 column (20×100 mm)

*² Filtrate was extracted three times with equivalent volume of diethylether

*³ Filtrate was passed through Sep-pak C₁₈ cartridge which was activated with 20 ml of methanol before use

ことから、*H. akashiwo* のろ液を XAD-4 樹脂で処理しても、*S. costatum* に対する増殖抑制作用は全く低下しなかった。

4) 弱アルカリ-エーテル処理区

最大細胞密度は対照区の1.1%に留まっていた(表4)ことから、*H. akashiwo* のろ液を弱アルカリ性条件下でエーテル処理しても、*S. costatum* に対する増殖抑制作用は全く低下しなかった。

5) 酸性-エーテル処理区

最大細胞密度は対照区の63.9%に達し、増殖速度も対照区とほとんど変わらなかったことから(表4)、*H. akashiwo* のろ液を酸性条件下でエーテル処理すると、*S. costatum* に対する増殖抑制作用が低下した。

6) ODS 樹脂処理区

最大細胞密度は対照区の85.6%に達し、増殖速度も対照区とほとんど変わらなかったことから(表4)、*H. akashiwo* のろ液を弱酸性条件下で ODS 樹脂処理すると、*S. costatum* に対する増殖抑制作用が低下した。

考 察

珪藻類に対する鞭毛藻のアレロパシー物質に関する考察

H. akashiwo が珪藻 *S. costatum* の増殖を抑制するアレロパシー作用については、Pratt (1966) の先駆的な研究が広く知られている(論文中では *Olisthodiscus luteus* として記載されている)。Naragansett 湾における7年間の現場観察によって、*H. akashiwo* が増殖する時には *S. costatum* が衰退することを見出し、さらに *H. akashiwo* の培養ろ液が *S. costatum* の増殖を抑制することを室内実験において確認している。原因物質は水溶性でかつ耐熱性を有していることから、おそらくタンニン

酸ではないかと結論づけられている(Pratt 1966)。*H. akashiwo* と *S. costatum* が現場で共存的に赤潮を形成できないという結果は、Tomas (1978) と Honjo and Tabata (1985) においても示唆されている。

今回の広島湾における調査においても、*H. akashiwo* の赤潮形成とほぼ同期して珪藻類の細胞密度が著しく低くなる現象が観察された(図3)。さらに顕微鏡下での観察によると、*H. akashiwo* 海水中の *S. costatum* の細胞の多くは連鎖が歪曲したり断片化しており、しかもその細胞自体は非常に小型で色素も薄かった。このような現象は栄養塩が欠乏した場合にも観察されるが、今回の実験において栄養塩を十分に添加した *H. akashiwo* の培養ろ液に *S. costatum* を接種した場合にも同様な現象が観察されたことから、現場海域における同様な現象が栄養塩の欠乏以外にアレロパシー作用によっても引き起こされている可能性が考えられた。

微細藻類が産生するアレロパシー物質は、脂肪酸、アクリル酸、フェノール化合物など多種多様な物質が知られている(Rice 1984)。この中でも脂肪酸は藻類が産生するアレロパシー物質として比較的多く報告されている成分のひとつである(Craigie and McLachlan 1964, Takagi et al. 1984, Kakisawa et al. 1988, Gentien and Arzul 1990, Imada et al. 1991, Perez et al. 1997, Arzul et al. 1993; 1995; 1999)。特に遊離脂肪酸はそれ自身が溶血活性などの毒性を示し(Curtis et al. 1974, Takagi et al. 1984, Lawrence et al. 1995)、微細藻類が産生する魚毒性成分としても知られている(Kamiya et al. 1979, 西尾 1982, Okaichi 1989, Sola et al. 1999)。

今回の実験でも、*S. costatum* および *C. antiqua* の培養ろ液中には、*S. costatum* の増殖を抑制する、つまりア

アレロパシー作用を引き起こす物質が溶存している可能性が強く示唆された。以下に *H. akashiwo* の培養ろ液の各処理区における *S. costatum* の培養実験の結果から、アレロパシー物質の推定を試みた。

H. akashiwo の培養ろ液中に存在するアレロパシー物質は、① *H. akashiwo* の培養ろ液から限外ろ過で分子量 3,000 以上の物質を除いても、*S. costatum* の増殖を抑制する活性（以後はアレロパシー作用）は全く低下しなかったことから、アレロパシー物質は明らかに低分子物質である。② この物質は 80°C の加熱でもほとんど失活しないことから、水溶性でかつ耐熱性を有している。③ フェノール系の疎水性物質を吸着する作用のある XAD-4 樹脂に全く吸着されないが、低極性物質に親和性を示す ODS 樹脂にはほとんど吸着される。④ 海水よりやや高い pH 8.8 の弱アルカリ性条件下ではエーテル層に移行しないが、pH 3.2 の酸性条件下ではエーテル層に移行する等の特性を有していた。今回はアレロパシー物質の精製を十分に行っていないため、GC/MS などによる同定を行うことができなかった。しかしながら、今回得られたアレロパシー物質の特性と既知の知見を総合して判断すると、*H. akashiwo* のアレロパシー物質は脂肪酸関連の物質である可能性が非常に高い。*C. antiqua* のアレロパシー物質についても、耐熱性で低分子であることから、*S. costatum* 同様に脂肪酸関連物質である可能性が高い。しかしながら、この他にも全く異なる成分が少ないながら関与している可能性もあり、引き続き詳細な検討が必要である。

H. akashiwo や *C. antiqua* の脂質組成については Nichols *et al.* (1987)、山岡他 (1992)、および Keusgen *et al.* (1997) で、また遊離脂肪酸組成と含量については西尾 (1982) および Suzuki and Matsuyama (1995) で既に報告されている。これらの報告によれば、*H. akashiwo* の脂肪酸は Palmitic acid (16:0) を主成分としているが、高度不飽和脂肪酸の一種である Eicosapentaenoic acid (20:5) も多量に含まれており、珪藻や渦鞭毛藻に比較すると高度不飽和脂肪酸の割合がかなり高いことが示唆されている (Suzuki and Matsuyama 1995, Matsuyama and Suzuki 1998)。この Eicosapentaenoic acid は褐藻類、珪藻、および渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* から分離されたアレロパシー物質のひとつである (Imada *et al.* 1991, Kakisawa 1988, Kajiwara 1992)。さらに、*H. akashiwo* や *C. antiqua* の細胞表層にはオスミウム酸で染色される脂質の顆粒が多数認められることから (原 1990)、これらの種が脂質（水溶性で低分子であることから多くは遊離脂肪酸と思われる）を細胞外に滲出し、これによって *S. costatum* などの珪藻類がアレロパシー作用を受けると考えるのが妥当であろう。実際に、渦鞭毛藻 *Gyrodinium aureolum* (*Gymnodinium cf.*

nagasakiense) が産生する遊離脂肪酸が珪藻類の増殖を阻害するという報告もある (Gentien and Arzul 1990, Arzul *et al.* 1993)。

溶血作用は脂肪酸だけに限らず、その複合体も強い作用を示し、いくつかの有害赤潮藻からは実際に脂肪酸関連物質が多数報告されている。例えば、Parrish *et al.* (1998) や Yasumoto *et al.* (1990) は、有害赤潮藻 *G. aureolum* と *Chrysochromulina polylepis* が産生する物質が強い溶血活性を示し、原因物質として糖脂質である monoglycerol diacylglycerol または diglycerol diacylglycerol を同定している。これらの物質は数種の渦鞭毛藻や大型海藻にも認められ、強い溶血作用や巻貝への摂餌誘因作用を示すという (Oshima *et al.* 1994, Parrish *et al.* 1998, Sakata and Ina 1985)。いずれの脂質も脂肪酸に親水性の糖が結合しており、基本的な構造が界面活性剤に似ている。

この他にも、Uchida (1977) は *Prorocentrum micans* が産生するアレロパシー物質の性状を、熱に不安定で透析膜を通過しない高分子物質であると報告している。また、Honjo (1993) は、*H. akashiwo* が産生する珪藻類のアレロパシー物質として多糖タンパク質複合体を報告している。脂質以外にもアレロパシー作用を示す物質は存在する可能性が考えられることから、引き続き詳細な検討が必要である。

なお、一部の報告では珪藻類が鞭毛藻に対するアレロパシー作用も報告されている (Imada *et al.* 1991, 宮下他 1994, 広海他 1995)。今回の試験に先立ち、*S. costatum* と *Chaetoceros didymus* の培養ろ液が、*H. akashiwo*、*C. antiqua*、および *Prorocentrum dentatum* の 3 種の鞭毛藻の増殖に及ぼす影響を予備的に調べたが、いずれも顕著な増殖阻害作用は見いだされなかった (未発表)。従って、少なくとも今回用いた *S. costatum* と *C. didymus* の培養ろ液中には、鞭毛藻の増殖を阻害するアレロパシー物質は非常に少ないものと判断された。

珪藻類に対する鞭毛藻のアレロパシー作用の生態学的考察

アレロパシー作用は特定の生物が栄養競合者を排除する作用であり、生態学的観点から見ると非常に重要な作用と言える。陸上植物の間では、こうしたアレロパシー作用が種の遷移を優位に進める上で有効に機能していることが既に知られている (Putnam and Tang 1986)。今回試験に用いた *H. akashiwo* と *S. costatum* は富栄養化した海域で高密度出現する代表的な微細藻類であるが、Pratt (1966) が示したように、両者が全く同時期にブルームを形成することは希である。こうした種間競合を説明する場合、今回示したようなアレロパシー作用が実際の海域でも影響している可能性は十分に予想される。

しかしながら、今回の結果は、無菌のバッチ培養下で

高密度に増殖した *H. akashiwo* や *C. antiqua* の培養ろ液で得られたものであり、これをそのまま開放系である現場海域に適用するのは問題がある。つまり、現場海域が開放系でしかもバクテリアなどの他種多様な微生物の活動が活発な状況では、細胞外に分泌されたアレロパシー物質は希釈や分解などの作用を受け、実際の効力は無菌培養下で得られた結果よりも弱いと推定される。実際に *H. akashiwo* の培養ろ液を新鮮培地で 1/2 に希釈するだけで、*S. costatum* に対するアレロパシー作用はほとんど消失した（未発表）。従って、現場海域における *H. akashiwo* の *S. costatum* に対するアレロパシー作用は、赤潮のような高密度環境下においてのみ発現していると考えられるべきであろう。実際に微細藻類の種間競合について現場海域を想定した条件下で調べた結果では、細胞外に滲出した物質によるアレロパシー作用の影響よりも、栄養塩をめぐる競合の方がより重要であるという報告もある（Elbrächter 1976, Kyser 1979）。従って、*H. akashiwo* のアレロパシー作用は赤潮の形成段階で相手を排除するために機能しているというよりは、ブルームを可能な限り長期化させる役割を担っていると思われる。

ところで、近年になって、ある種の植物プランクトンが他の植物プランクトンに直接接触して、相手を死滅させたり増殖を抑制したりする現象が報告されるようになった。例えば、有殻渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* と無殻渦鞭毛藻 *Gyrodinium instriatum* を混合すると、*G. instriatum* は *H. circularisquama* と接触した瞬間に直ちに遊泳を停止し、最終的に破裂して死滅する。詳細に観察すると、*H. circularisquama* の培養ろ液は全く影響を及ぼさないにも拘わらず、*H. circularisquama* の細胞とわずかに数回接触するだけで、*G. instriatum* は瞬間的に運動能力を失って死滅するという（Uchida *et al.* 1995）。さらに Uchida *et al.* (1999) は、*H. circularisquama* と *Gymnodinium mikimotoi* との相互作用についても検討し、この場合は双方の細胞密度の違いによって、増殖を抑制される側が交代することを見出した。本報告で調べた *H. akashiwo* の *S. costatum* に対する影響のように、ある生物が細胞外へ分泌した物質が海水という媒体を経由して相手の細胞に影響を与える場合には一般的にアレロパシーと解釈されるが、海水という媒体を経由せず、直接接触によって相手に影響を及ぼす場合には同様の解釈が当てはまらない。つまり、生物が捕食や攻撃あるいは防御のために直接接触等によって相手に影響を及ぼす作用のことをアロモン (allomone) と呼ぶことから、*H. circularisquama* と *G. mikimotoi* との間に観察される相互作用はアロモンである可能性がある。アレロパシーのように、細胞外に滲出した物質は希釈や分解作用を受けるため、実際の海域においてどの程度効力を発揮してい

るか不明であるが、細胞同士が直接接触することによって阻害作用が発揮されるとなると、開放系である実際の海域でも十分に効力を発揮できる可能性が考えられる。

このように、植物プランクトン間の相互作用はアレロパシーに限らず様々な作用があることが明らかになりつつある。現場海域における植物プランクトン群集の遷移は、単純に水温、塩分、光強度、あるいは栄養塩濃度などの物理化学的要因のみによって進行しているのではなく、これらの物理化学的環境という場をめぐる複数種の種間競合によっても進行していく。特に富栄養化した沿岸域や内湾域など、種の多様性が低くしかも生物密度も非常に高い海域では、赤潮の時などは種間競合が激しく、アレロパシー作用やアロモン作用などの競合者（あるいは捕食者）を排除する能力の有無が種の優占化機構において重要な役割を果たしていると考えられる。今後は現場海域においてこうした作用が植物プランクトン群集の遷移や赤潮の形成・維持に寄与しているのかを検討する必要がある。

要 約

1. 広島湾における観測において、*H. akashiwo* 赤潮発生時には珪藻類の細胞密度が著しく低くなり、*H. akashiwo* の赤潮が終息すると急激に細胞密度が高くなる現象が観察された。
2. ラフィド藻 *H. akashiwo* と *C. antiqua* の無菌培養ろ液に栄養塩を再添加し、珪藻 *S. costatum* を培養すると増殖が著しく抑制されたことから、アレロパシー物質の存在が示唆された。
3. アレロパシー物質は耐熱性、低分子量 (M. W. 3,000 以下)、酸性条件下でエーテル層に移行、XAD-4 樹脂に吸着せず ODS (Sep-pak C₁₈) に強く吸着する等の性質を示したことから、脂質 (特に脂肪酸) である可能性が強く示唆された。

謝 辞

ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の無菌培養株を提供戴くと共に、培養試験に際してご指導を戴いた赤潮環境部の山口峰生室長、および珪藻 *Skeletonema costatum* の無菌培養株を提供に戴いた大阪市立大学環境都市工学科の矢持進助教授に謝意を示す。また、植物プランクトンの同定・計数に際してご指導を戴いた九州大学の本城凡夫教授に御礼を申し上げる。瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部長の玉井恭一博士には本稿を校閲していただき、貴重なご意見を頂いた。記して謝意を表す。

文 献

- Arzul, G., P. Gentien, G. Bodennec, F. Toularastel, A. Youenou, and M. P. Crassous, 1995. Comparison of

- toxic effects in *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* polyunsaturated fatty acids, in "Harmful Marine Algal Blooms" (eds. by Lassus, P., G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, and C. Marcaillou), Lavoisier, Paris, 1995, pp. 395-400.
- Arzul, G., E. Erard-Le Denn, C. Videau, A. M. Jegou, and P. Gentien, 1993. Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gyrodinium* cf. *aureolum*. in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea" (eds. by Smayda, T. J. and Y. Shimizu), Amsterdam, Elsevier, 719-724.
- Arzul, G., M. Seguel, L. Guzman, and E. E. Denn, 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **232**(2), 285-295.
- Brand, L. E., R. R. L. Guillard, and L. S. Murphy, 1980. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.*, **3**, 193-201.
- Craigie, J. S. and J. McLachlan, 1964. Excretion of colored ultraviolet-absorbing substances by marine algae. *Can. J. Bot.*, **42**, 23-33.
- Curtis, R. F., D. T. Coxon, and G. Levett, 1974. Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimps (*Artemia salina*). *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **12**, 233-235.
- Elbrächter, M., 1976. Population dynamic studies on phytoplankton cultures. *Mar. Biol.*, **35**, 201-209.
- Eppley, R. W., O. Holm-Hansen, and J. D. H. Strickland, 1968. Some observations of vertical migration of dinoflagellates. *J. Phycol.*, **4**, 333-340.
- Gaines, G. and M. Elbrächter, 1987. Heterotrophic nutrition. in "Dinoflagellate" (ed. by F. J. R. Taylor), Blackwell, London, pp. 224-268.
- Gentien, P. and G. Arzul, 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium* cf. *aureolum* (Dinophyceae). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **70**(3), 571-581.
- 原 慶明, 1990. 日本の赤潮生物. 日本水産資源保護協会, 秀和, 東京, pp. 333, 347.
- 広海十朗・今西大介・門田定美, 1995. 赤潮ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* に対する珪藻 *Cylindrotheca closterium* の増殖阻害効果. 日本大学農獣医学部学術研究報告, **52**, 122-125.
- Honjo, T. and K. Tabata, 1985. Growth dynamics of *Olisthodiscus luteus* in outdoor tanks with flowing coastal water and in small vessels. *Limnol. Oceanogr.*, **30**(3), 653-664.
- Honjo, T., 1993. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea" (eds. by Smayda, T. J. and Y. Shimizu), Amsterdam, Elsevier, 33-41.
- 飯塚昭二・入江春彦, 1972. 大村湾における *Gymnodinium* '65年型赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 22-33.
- Imada, N., K. Kobayashi, K. Tahara, and Y. Oshima, 1991. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth on other phytoplankton. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **57**(12), 2285-2290.
- 伊藤克彦・今井一郎, 1987. ラフィド藻. 赤潮生物研究指針, 日本水産資源保護協会編, 秀和, 東京, 304-473.
- Kakisawa, H., F. Asari, T. Kusumi, T. Toma, T. Sakurai, T. Oohusa, Y. Hara, and M. Chihara, 1988. An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *Phytochemistry*, **27**(3), 731-735.
- Kamiya, H., K. Naka, and Y. Hashimoto, 1979. Ichthyotoxicity of flagellate *Uroglena volvox*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **45**(1), 129.
- Kamykowski, D., H. Yamasaki, A. K. Yamasaki, and G. J. Kirkpatrick, 1998. A comparison of how different orientation behaviors influence dinoflagellate trajectories and photoresponses in turbulent water columns. in "Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms" (eds. by Anderson, D. M., A. D. Cembella, and G. M. Hallegraeff), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 581-599.
- Keusgen, M., J. M. Curtis, P. Thibault, J. A. Walter, A. Windust, and S. W. Ayer, 1997. Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*. *Lipids*, **32**(10), 1101-1112.
- Koizumi, Y., T. Uchida, and T. Honjo, 1996. Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during a red tide in Hoketsu Bay, Japan. *J. Plankton Res.*, **18**(2), 289-294.
- Kyser, H., 1979. Growth interactions between marine dinoflagellates in multi-species culture experiments. *Mar. Biol.*, **52**, 357-369.
- Lawrence, J. F., R. K. Chadha, W. M. N. Ratnayake, and J. F. Truelove, 1995. An incident of elevated levels of unsaturated free fatty acids in mussels from Nova Scotia and their toxic effect in mice after intraperitoneal injection. *Natural Toxins*, **2**(5), 318-321.
- Matsuyama, Y. and T. Suzuki, 1998. Free fatty acid in *Heterocapsa circularisquama* and *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae). *Fish. Sci.*, **64**(4), 662-663.
- 宮下一明・木幡邦男・渡辺正孝, 1994. 赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* に対する珪藻 *Amphiprora hyalina* の増殖阻害効果. 日本大学農獣医学部学術研究報告, **51**, 158-163.
- Nichols, P. D., J. K. Volkman, G. M. Hallegraeff, and S. I. Blackburn, 1987. Sterols and fatty acids of the red tide flagellates *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* (Raphidoceae). *Phytochemistry*, **26**, 2537-2541.
- 西尾幸郎, 1982.4. 有毒・有害プランクトンの魚介類への影響. 有毒プランクトン—発生・作用機構・毒成分. 水産学シリーズ, 日本水産学会監修, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 50-61.
- Okaichi, T., 1989. Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan, in "Red Tides" (eds. by Okaichi, T., D. M. Anderson, and T. Nemoto), Elsevier, New York, 137-142.
- Oshima, Y., S. Yamada, K. Matsunaga, T. Moriya, and Y. Ohizumi, 1994. A monogalactosyl diacylglycerol from a cultured marine dinoflagellate, *Scrippsiella trochoidea*. *J. Nat. Prod.*, **57**(4), 534-536.
- Parrish, C. C., G. Bodenec, and P. Gentien, 1998. Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species. *Phytochemistry*, **47**(5), 783-787.
- Perez, E., W. G. Sawyers, and D. F. Martin, 1997. Identification of allelopathic substances produced by *Nannochloris oculata* that affect a red tide organism, *Gymnodinium breve*. *Biomedical Letters*, **56**(221), 7-14.
- Putnam A. R. and C. S. Tang, (eds.) 1986. "The Science of Allelopathy", John Wiley & Sons, New York, p. 317.
- Pratt, D. M., 1966. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olisthodiscus luteus* in Naragansett Bay and in culture. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 447-455.
- Provasoli, L., J. J. A. McLaughlin, and M. R. Droop, 1957.

- The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiol.*, **25**, 392-428.
- Rice, E. L. (ed.), 1984. "Allelopathy", 2nd ed., Academic Press, London, p. 422.
- Sakata, K and K. Ina, 1985. Digalactocyl diacylglycerols and phosphatidylcholines isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 659-665.
- Sola, F, A. Masoni, B. Fossat, J. Porthe-Nibelle, P. Gentien, and G. Bodenec, 1999. Toxicity of fatty acid 18:5n3 from *Gymnodinium* cf. *mikimotoi*: I. Morphological and biochemical aspects on *Dicentrarchus labrax* gills and intestine. *J. Appl. Toxicol.*, **19**(4), 279-284.
- Suzuki, T. and Y. Matsuyama, 1995. Determination of free fatty acids in marine phytoplankton causing red tides by fluorometric high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1211-1214.
- Takagi, T., K. Hayashi, and Y. Itabashi, 1984. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **50**(8), 1413-1418.
- Tomas, C. R., 1978. *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival. *J. Phycol.*, **14**, 309-313.
- Uchida, T., 1977. Excretion of a diatom-inhibitory substance by *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *日生態会誌*, **27**, 1-4.
- Uchida, T., S. Toda, Y. Matsuyama, M. Yamaguchi, Y. Kotani, and T. Honjo, 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **241**(2), 285-299.
- Uchida, T., M. Yamaguchi, Y. Matsuyama, and T. Honjo, 1995. The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa* sp. kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **118**, 301-303.
- 山岡到保・滝村 修・布施博之・上村一雄, 1992. *Chattonella antiqua* の脂肪酸組成への環境因子の影響. 中国工業技術試験所報告, **39**, 37-44.