

リアルタイム PCR を用いた東京湾海底堆積物中からの *Chattonella marina* (ラフィド藻綱) DNA の検出

出村幹英¹・小林広茂²・横山智子²・山田佳昭³・河地正伸^{1*}

¹ (国立研究開発法人) 国立環境研究所 (〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)

² 千葉県環境研究センター (〒 261-0005 千葉県美浜区稲毛海岸三丁目 5-1)

³ 神奈川県水産技術センター (〒 238-0237 神奈川県三浦市三崎町城ヶ島養老子)

Mikihide Demura¹, Hiroshige Kobayashi², Tokomo Yokoyama², Yoshiaki Yamada³ and Masanobu Kawachi^{1*}: Real-Time PCR assay for detection of DNA of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from sea sediments in Tokyo Bay, Japan. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 63: 190-195, November 10, 2015

In Tokyo Bay, motile cells of the raphidophyte *Chattonella marina* var. *marina* were first observed in August 2008. During the following winter, from December 2008 to January 2009, motile cells of the species recurred and caused mortality of cultured fishes in Tokyo Bay. In order to survey temporal change of the population size of *C. marina* in Tokyo Bay, we developed a specific DNA marker (RT-ChamoF: 5'-CCCTTGTTCCCTCGGGAAG-3', RT-ChamoR: 5'-CTCAACGGTTGTTATCTCG-3') applicable to quantitative assay using Real-Time PCR. The efficiency and specificity of the DNA marker was confirmed by DNA samples of both microalgal strains (27 strains of raphidophytes, 7 strains of diatoms and 3 strains of dinoflagellates) and natural sediments collected from the coastal area where massive blooms of *Chattonella marina* often occurred. We applied the DNA based quantitative assay to the sediments collected from stations in Tokyo Bay and 8 ports in the neighboring coastal area of Tokyo Bay. In total, 118 samples were collected in 2008, 2010, 2011 and 2012 and used for the quantitative assay. We could detect *C. marina* DNA from 8 stations of Tokyo Bay (2008: 1 of 9 stations; 2010: 3 of 30, 2011: 3 of 26; 2012: 1 of 41). The highest number of DNA amount equivalent to cell number per 1kg wet sediment was 2,841 in 2010. Average of the cell number decreased gradually from 2010 to 2012. Our results suggest that *C. marina* has a long-term seed stock in Tokyo Bay at least since 2008 and that the population density would tend to reduce.

Key Index Words: *Chattonella marina*, cyst, Real-Time PCR, Tokyo Bay

¹National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

²Chiba Prefectural Environmental Research Center, Mihama, Chiba 261-0005, Japan

³Kanagawa Prefectural Fisheries Technology Center, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan

* Author for correspondence: kawach9i@nies.go.jp

緒言

Chattonella marina (Subrahmanyam) Y. Hara et Chihara, *C. marina* var. *antiqua* (Hada) Demura et Kawachi, *C. marina* var. *ovata* (Y. Hara et Chihara) Demura et Kawachi は不等毛植物門ラフィド藻綱に属する海産植物プランクトンである。大量増殖によって赤潮を形成し、これまで多くの漁業被害を引き起こしてきた (岡市 1997)。3 変種は独立した 3 種として扱われることもあるが、近年、Demura *et al.* (2009) によって形態ならびに遺伝的背景の詳細な再解析が行われ、変種として記載された。1970 年代、80 年代においては瀬戸内海が *C. marina* による赤潮被害の中心であったが、2000 年以降には八代海、有明海など九州海域に被害の中心が移行している (水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 2009, 水産庁九州漁業調整事務所 2010, 出村・河地 2012)。

これまで *C. marina* 3 変種の分布が日本で確認されてきたのは、三河湾以西の沿岸域であった (岡市ら 1997)。しかし、筆者らによって東京湾富津沖 2008 年 8 月 6 日と 8 月 18 日採水の表層海水中から、それぞれ約 300 cells/L と 4 cells/L

L の *C. marina* var. *marina* の栄養細胞が初めて確認された (Demura *et al.* 2014)。また、2008 年 12 月末から 2009 年 1 月にかけて東京湾口において *C. marina* var. *marina* の赤潮が発生し畜養魚に被害を与えた (神奈川県水産技術センター資源環境部 2009)。

東京湾ではこれまで約 30 年にわたって千葉県環境研究センター、神奈川県水産技術センターによって東京湾全域をカバーする生息プランクトン調査が行われてきた。また、多くの藻類相研究もなされてきた (例えば野村 1998, Nakane 2008)。しかし、*C. marina* var. *marina* を含む *C. marina* 3 変種が記録されたことはなかった。すなわち、東京湾の *C. marina* var. *marina* 集団は近年形成された可能性が高い。Demura *et al.* (2014) が行った日本沿岸の *C. marina* var. *marina* 集団におけるマイクロサテライトマーカーを使った集団遺伝学的解析では、東京湾 *C. marina* var. *marina* 集団は、鹿児島湾集団と遺伝的類縁関係が深いことに加えて、日本沿岸の集団からは検出されなかった多数の独自の遺伝子型を併せもつことなどが判明している。Demura *et al.* (2014) は東

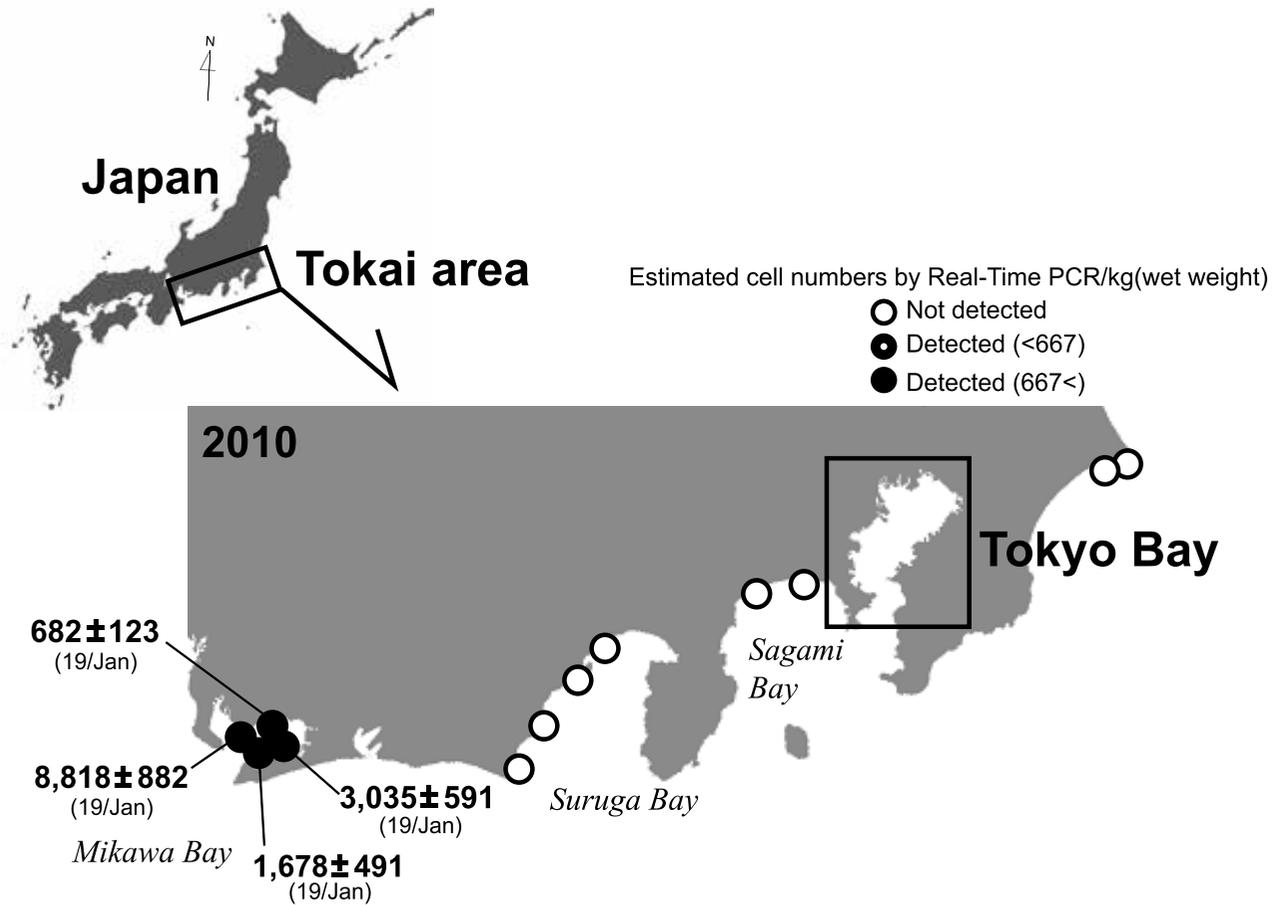


Fig. 1. Study area and detected DNA amount equivalent to cell number of *Chattonella marina* in 2010 in Mikawa Bay.

京湾の *C. marina* var. *marina* 集団の起源について、黒潮による鹿児島湾からの集団の移入に加えて、外国からの船舶バラスト水などを媒体とした侵入の可能性を指摘している。

C. marina var. *marina* は生活史の1つのステージとして休眠細胞(シスト)となることが判明している(今井・伊藤1986)。シストは、赤潮またはブルームの末期に小型細胞から形成されることが観察されており(Nakamura & Umemori 1991, 今井ら1993), Yamaguchi & Imai (1994) は顕微蛍光測光法による核DNA量の測定結果から、シストの核相が単相であることを報告している。一方, Nakamura *et al.* (1990) と Demura *et al.* (2012) では、単相の小型細胞が接合することで複相となってシスト化する可能性が示されている。また Demura *et al.* (2012) では、複相の小型細胞の存在も示唆されており、接合を経ずに小型細胞がシスト化する可能性が提唱されている。*C. marina* var. *marina* の生活史については、今後更に検討が必要であるが、現時点ではシストの核相として、単相と複相の両方があり得ると判断できる。

シストは直径25–35 μm の半球形で珪藻殻や堆積物中の石に付着しており、シストの形態からは *C. marina* 3変種の区別は付かない(Imai & Itoh 1988)。今井(1990)は落射蛍光顕微鏡を用いた直接計数法、海底堆積物を培養し出現した栄養細胞数から存在量を推定する方法(MPN法)を提案し

ている。1970年代から *C. marina* が確認されている瀬戸内海播磨灘海域では堆積物1 cm^3 あたり最大723シスト、鹿児島湾では堆積物1 cm^3 あたり最大653シストとの直接計数法による報告がある(今井1990)。シストは翌年の赤潮のいわば「たね」にあたるため、各地水産試験場でもモニタリングを行っており、シストの量と次の年に出現した栄養細胞の数に相関があるとする研究もある(大山ら2006)。すなわち、海底堆積物中のシストの有無や存在量を確認することで、対象海域における *C. marina* の定着状況や集団の規模を推定することが可能になると考えられる。

そこで、我々は東京湾における *C. marina* の集団規模とその時間的変遷を推定することを目的として、複数年に渡って採取した堆積物中の *C. marina* のシスト存在量推定を試みた。前述の落射蛍光顕微鏡を用いた直接計数法の場合、シストの形態を正確に把握していないと識別が困難である。またMPN法は発芽可能なシスト数を計測する上で有効な手段であるが、培養条件や堆積物の処理・保管条件、そしてシストの成熟の度合い等によっては、培養試験時に発芽しないシストを計数できない可能性がある。そこで本研究では、リアルタイムPCR解析によって海底堆積物中の *C. marina* DNA量を明らかにし、シスト数を推定した。

リアルタイムPCRは環境中の標的生物の存在量を標的

物特異的 DNA マーカーによって検出する手法であり、これまで微細藻類においても環境中の存在量の定量化に有効であることが確かめられている (例えば Delaney *et al.* 2011, Srivastava *et al.* 2012)。 *C. marina* 3 変種を対象とする DNA マーカーの開発は、既に先行研究で報告されている (Bowers *et al.* 2006, Kamikawa *et al.* 2006)。しかし、予備的実験で Bowers *et al.* (2006) と Kamikawa *et al.* (2006) の DNA マーカーを培養株 (*C. marina* var. *marina* 5 株, *C. marina* var. *antiqua* 5 株) に対して試行したが、使用した反応酵素やリアルタイム PCR 解析装置が違うためか良好な結果が得られなかった。そこで我々は、*C. marina* var. *marina*, *C. marina* var. *antiqua*, *C. marina* var. *ovata* の 3 変種に適用可能なリアルタイム PCR 実験系の新たな確立を目指した。

材料と方法

海底堆積物の採取, DNA 抽出

東京湾の海底堆積物は、2008 年 8 月に 9 地点、2010 年 8 月から 9 月にかけて 34 地点、2011 年 8 月から 9 月にかけて 33 地点、2012 年 8 月から 9 月にかけて 41 地点において、簡易採泥器 (採取量約 40 ml, 幅 3 cm, 高さ 26 cm, 約 2.8 kg: 離合社田中式採泥器 cat. No. 5191-A と同等品) を用いて船上および岸壁から行った (Figs 1, 2)。この採泥器は海底着底時のみ採泥口が開く仕組みになっており、海底表層泥のみが採取可能である。2010 年 1 月には、三河湾 4 地点 (34° 44' 20" N 137° 08' 54" E, 34° 46' 20" N 137° 13' 23" E, 34° 44' 39" N 137° 14' 55" E, 34° 41' 50" N 137° 10' 52" E), 駿河湾 4 地点 (御前崎港 34° 36' 27" N 138° 13' 27" E, 大井川港 34° 36' 27" N 138° 13' 27" E, 清水港 34° 36' 27" N 138° 13' 27" E, 田子の浦港 34° 36' 27" N 138° 13' 27" E), 相模湾 2 地点 (大磯港 35° 18' 25" N 139° 19' 04" E, 腰越漁港 35° 18' 24" N 139° 29' 32" E), 銚子港 2 地点 (外川漁港 35° 18' 24" N 139° 29' 32" E, 犬若漁港 35° 41' 57" N

140° 50' 46" E) においても東京湾と同様に海底堆積物を採取した。採取した堆積物は保温バックに入れ、ただちに実験室に持ち帰り、DNA 抽出実験まで 15°C 暗所で保存した。

堆積物中に含まれる全生物の DNA 抽出を以下の方法で抽出した。まず、堆積物を 1.5 mL チューブにとり、卓上遠心器で約 3,000 rpm, 1 min の遠心後できるだけ海水を取り除いた。これは、海水中に存在する可能性のある栄養細胞やその断片をできる限り取り除くためである。その後湿重量を測定した (約 500 mg)。堆積物中に存在する全生物の DNA 抽出は ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) を用いプロトコルに従って行った。最終的な DNA 抽出液は 100 μ L である。この抽出キットは堆積物中に生息する生物の DNA 抽出のために特別に開発された抽出キットである。

リアルタイム PCR 解析

リアルタイム PCR 解析に使用した DNA マーカーは以下のように設計した。まず Demura *et al.* (2009) によって配列決定された rRNA 遺伝子間 ITS 領域について、*C. marina* 3 変種と近縁種の比較を行った。次に *C. marina* 3 変種のみがもつ配列部分から DNA マーカー RT-ChamoF: 5' -CCCTTGTTTCCTTCGGAAG-3', RT-ChamoR: 5' -CTCAACGGTTGTTATCTCG-3' を作成した。

DNA マーカーの特異性は、ラフィド藻綱の *C. marina* 3 変種と *C. subsalsa* Biecheler, *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada ex Y. Hara et Chihara などの 4 種を含む 27 株、さらに東京湾で優占することの多い珪藻と渦鞭毛藻の 7 種 10 株を用いて検証した (Table 1)。それぞれの培養株から DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出した後、堆積物から抽出した DNA と同じようにリアルタイム解析装置で解析した。

リアルタイム解析装置における解析は、1 反応チューブ 25 μ L あたり、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 12.5 μ L, RT-

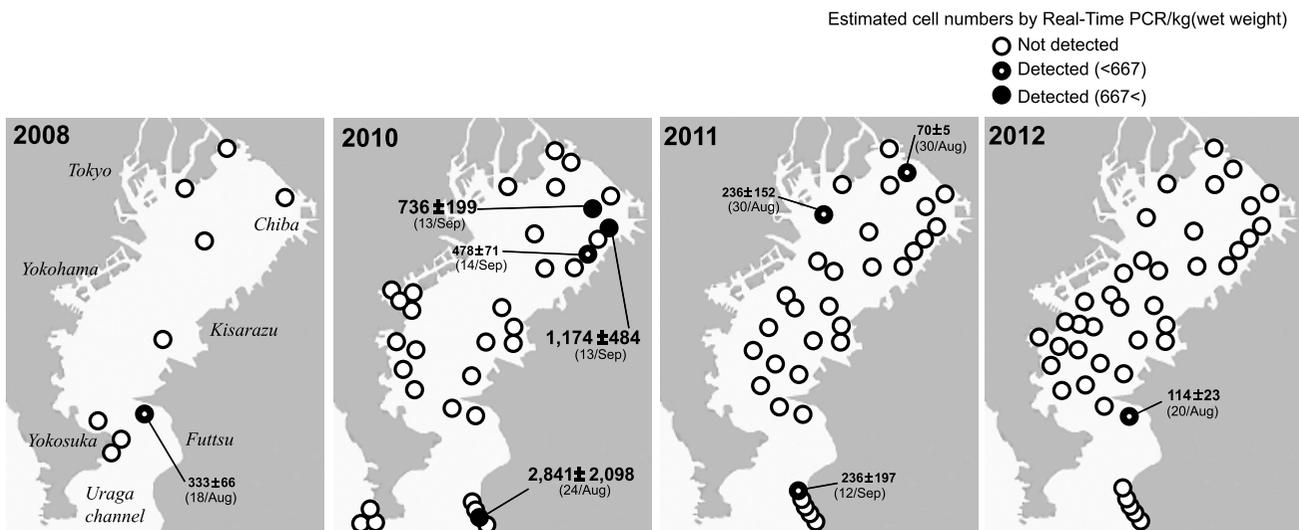


Fig. 2. DNA amount equivalent to cell number of *Chattonella marina* from 2008 to 2012 in Tokyo Bay.

ChamoF プライマー (10 μ M) 1 μ L, RT-ChamoR プライマー (10 μ M) 1 μ L, DNA 抽出液を 1 μ L, 滅菌水 9.5 μ L を混合したもので行った。サイクル反応は Dice Real Time System TP800 (TaKaRa) を用い, 95°C で 30 sec の後, 95°C で 5 sec と 60°C で 30 sec を 35 サイクル実施した。

C. marina 3 変種の細胞の存在量を定量するため, 次の手順で検量線を作成した。まず, *C. marina* var. *marina* 培養株 (DEM-127) を用いて, 約 100,000 細胞が含まれる培養サンプルを 3 つ用意し DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit) を用いて DNA サンプルを 3 つ準備した。次に DNA サンプルをそれぞれ 6 段階に希釈したサンプルを用いてリアルタイム解析装置で解析し, ソフトウェア Thermal Cycler Dice Real Time System Software ver. 2.10 (TaKaRa) によって検量線を得た ($Y = -3.229 \log(X) + 27.37$, $R^2 = 0.990$) (Fig. 3)。海底堆積物から抽出した DNA サンプルについては, この検量線を適用し, 海底堆積物湿重量 1 kg あたりに含まれる細胞数を算出した。各堆積物 DNA について 3 回のリアルタイム PCR 反応を行い平均と標準偏差を算出した。本来ならば, 検出対象であるシストを用いて検量線を作成する必要がある。しかし 検量線作成に必要な分量のシストを確保できなかったため, *C. marina* var. *marina* の栄養細胞で代用した。すなわち, 結果に示した検出数は, 堆積物中の様々な様態 (シストそのもの, 細胞残骸, 断片化したゲノム DNA 等) に由来する DNA の総量をリアルタイム PCR を用いた解析から栄養細胞数に換算した値

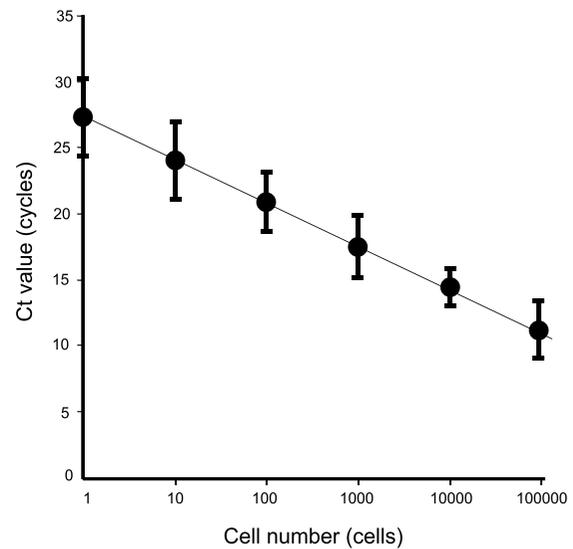


Fig. 3. The standard curve of our Real-Time PCR assay. The bar indicate the standard deviations.

(estimated cell numbers by Real-Time PCR)ということになる。単位としては, 便宜的に E-cells/kg (wet weight) を使うことにする。約 500 mg の解析堆積物サンプル中にシストが 1 つ存在すると, 海底堆積物湿重量 1 kg あたり約 2,000 シストとなる。3 回のリアルタイム PCR 反応を行うため, 平均値で海底堆積物湿重量 1 kg あたり 667 シストという数値 ($\{0+0+2,000\} / 3$)

Table 1. Specificities of designed primer sets (RT-Chamo F & R) in this study. '+' and '-' indicate positive and negative results by PCR, respectively.

Tested speceis and strains ^a	RT-Chamo F & R
Raphidophyceae	
<i>Chattonella marina</i> (Subrahmanyam) Y. Hara et Chihara var. <i>antiqua</i> (Hada) Demura et Kawachi NIES-1, NIES-84, NIES-86, NIES-2510, NIES-2509	+
<i>Chattonella marina</i> (Subrahmanyam) Y. Hara et Chihara var. <i>marina</i> NIES-3, NIES-14, NIES-115, NIES-121, NIES-559	+
<i>Chattonella marina</i> (Subrahmanyam) Y. Hara et Chihara var. <i>ovata</i> (Y. Hara et Chihara) Demura et Kawachi NIES-603, NIES-671, NIES-849, NIES-1980, NIES-1981	+
<i>Chattonella subsalsa</i> Biecheler NIES-2633, NIES-2634	-
<i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) Hada ex Y. Hara et Chihara NIES-5, NIES-6, NIES-9, NIES-10, NIES-561, DEM-51	-
<i>Fibrocapsa japonica</i> Toriumi et Takano NIES-136, NIES-560, NIES-605	-
<i>Haramonas dimorpha</i> Horiguchi NIES-761	-
Bacillariophyceae	
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann et Lewin NIES-1045	-
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp. DEM-22	-
<i>Skeletonema dohrnii</i> Sarno et Kooistra NIES-2533, NIES-2534	-
<i>Skeletonema japonicum</i> Zingone et Sarno NIES-2535, NIES-2536	-
<i>Skeletonema tropicum</i> Cleve NIES-2537	-
Dinophyceae	
<i>Prorocentrum dentatum</i> Stein NIES-682, DEM-1	-
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller NIES-237	-

^a 'NIES' strains were provided from Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies. 'DEM' strains were established by M. Demura.

≒ 667) がシスト単体での存在を検出できる最小平均値となる。この値以下の場合、解析サンプルに含まれていたのは細胞断片である可能性が高いが、*C. marina* の存在の可能性を示すという意味で Fig. 2 において区別して表示した。

結果

我々が開発した *C. marina* 3 変種に特異的な DNA マーカーである RT-ChamoF と RT-ChamoR の DNA マーカーは、標的とする *C. marina* var. *marina* をはじめ *C. marina* 3 変種でのみ増幅が確認され、特異性が極めて高いことが判明した (Table 1)。同 DNA マーカーを *C. marina* の定着が確認されている三河湾海底堆積物由来の DNA 抽出液に適用することで、全ての試料から定量的に *C. marina* を検出することに成功した (Fig. 1)。

東京湾堆積物について 2008 年から 2012 年の結果を Fig. 2 に示す。初めて *C. marina* var. *marina* の栄養細胞が海水中から発見された 2008 年に採取した海底堆積物から抽出した *C. marina* DNA から推定した細胞量は、富津沖の 8 月 18 日に採取した堆積物において 333 ± 66 E-cells/kg であった。この海域は海水中から栄養細胞が初確認された地点でもある。2010 年の調査では、30 地点の堆積物を解析した結果、東京湾奥の 3 地点で 478 ± 71 E-cells/kg, 736 ± 199 E-cells/kg, $1,174 \pm 484$ E-cells/kg が検出された。また、浦賀水道の千葉県側 1 地点から $2,841 \pm 2,098$ E-cells/kg の検出があった。東京湾で検出された 4 地点の平均は $1,307$ E-cells/kg であった。2011 年の調査では、26 地点の堆積物を解析した結果、湾奥の 2 地点で 70 ± 5 E-cells/kg, 236 ± 152 E-cells/kg, 浦賀水道千葉県側 1 地点で 236 ± 197 E-cells/kg が検出された。検出された 3 地点の平均は 136 E-cells/kg であった。2012 年の調査では、41 地点の堆積物の解析から 1 地点のみ、富津岬の南側で 114 ± 23 E-cells/kg が検出された。

三河湾では、1977 年ごろから継続的に *C. marina* var. *marina* や *C. marina* var. *antiqua* の生息が確認されており (岡市ら 1997)、定着が確立されたと考えられている。2010 年に採取された 4 地点の堆積物の全てで *C. marina* が検出され、最大で $8,818 \pm 882$ E-cells/kg に達した (Fig. 1)。4 地点の平均は $3,553$ E-cells/kg であった。2010 年に採取された駿河湾、相模湾、そして銚子港の堆積物に関しては、いずれの試料からも *C. marina* DNA は検出されなかった。

考察

我々の確立したリアルタイム解析によって、2008 年に出現して以来、不明であった東京湾の *C. marina* 集団の規模と時間的推移を推定することができた。

C. marina が初めて東京湾で確認された 2008 年の 8 月の解析では、解析地点数も検出数も非常に少なく、十分な集団規模推定はできなかったが、*C. marina* 集団は東京湾全域に生息するような大規模な集団ではなかったと推察できる。Demura *et al.* (2014) による 2008 年 8 月の東京湾 *C. marina* var. *marina*

集団の遺伝的組成解析では、鹿児島湾やそれ以外の複数の集団が東京湾集団の起源として考えられている。すなわち、2008 年に一度に複数の集団が東京湾に侵入したというよりも、それ以前から *C. marina* var. *marina* の侵入は起きており、2008 年になって顕在化した可能性が高いと考えられる。

2010 年は、2008 年には検出されなかった湾奥の複数地点からも検出され、検出数も解析した年の中では最大となった。*C. marina* var. *marina* の集団規模は 2008 年から 2010 年にかけて拡大していた可能性がある。2011 年以降は検出地点、検出数ともに減少に転じ、2012 年になると検出は 1 地点のみであった。*C. marina* var. *marina* の集団規模は、2010 年以降、2011 年、2012 年にかけて徐々に縮小したものと推察される。

三河湾では、1970 年代から *C. marina* の出現が認められている (岡市ら 1997)。本研究で推定した三河湾における *C. marina* 存在量は、東京湾における最大の検出数であった 2010 年と比べ約 3 倍であった。東京湾の *C. marina* var. *marina* 集団は三河湾集団と比較して、小さな規模であると考えられる。

Demura *et al.* (2014) は、鹿児島湾から黒潮による長距離細胞移動の可能性について考察している。鹿児島湾集団との類縁性を示す遺伝子型が確認されたこと、三河湾から東京湾の中間の港湾において *C. marina* は検出されなかったこと、そして東京湾湾口の東海岸では、黒潮に由来するサンゴを含む多様な亜熱帯性海産動物の生息が確認されている (例えば Veron 1992, 濱田 1993) こともこの推測を支持する。先にも述べたように Demura *et al.* (2014) は、東京湾の集団において他の日本の集団には認められない遺伝子型が多数発見されたことから、外国の *C. marina* var. *marina* 集団の侵入の可能性も指摘している。東京湾には多数の国際航路の大型船舶が出入りしていることから、東京湾の *Chattonella* 集団がこうした大型船舶のバラスト水に由来する可能性も考えられる。東京湾の *C. marina* var. *marina* がどこからやってきたのかを明らかにするには、三河湾以東の湾における継続的な調査、黒潮海水や船舶バラスト水の調査等が必要といえる。本研究で開発された *Chattonella* 集団に特異的な DNA マーカーは、こうした調査に有効な手段となることが期待できる。2008 年から 2012 年にかけての検出地点分布と検出細胞数の推移を見る限りにおいては、今後、東京湾の *Chattonella* 集団はいずれ消滅する可能性も考えられる。しかし *Chattonella* のシストは、休眠解除状態から再び低温環境で再休眠状態になることが培養実験から明らかにされている (今井 1990)。筆者らの実験でも、瀬戸内海で 2005 年 5 月に採取して 15°C 暗所で保存した堆積物について、3 年後に培養実験を行い *C. marina* var. *antiqua* の栄養細胞の発芽を確認した (出村・未発表データ)。このように *Chattonella* のシストは、発芽能を保持したまま少なくとも 3 年の長期にわたり堆積物中で生存することから、少数のシストから再び大量増殖が引き起こされる可能性についても考慮すべきである。また、東京湾における定期的なモニタリング調査では、2012 年と 2013 年

にも海水試料から *C. marina* の栄養細胞が観察されている(飯村ら 2013)。集団が縮小傾向にあるとは言え、引き続き *Chattonella* 赤潮への注意が必要と言える。

本研究で行ったリアルタイム PCR 解析法は、海水試料についても適用可能である。東京湾 *C. marina* var. *marina* 集団の動態については、シストの現存量調査とともに、海水中の栄養細胞についても定量的に把握しておく必要がある。その調査の際、大量の海水試料をフィルター濾過して、通常のモニタリングでは検出できないような低密度の栄養細胞の検出にも利用可能であり、東京湾のような低密度海域での海水中の栄養細胞のモニタリングにも適用可能な有用な手法となることが期待できる。

リアルタイム PCR 解析法は、その特異性と定量性から、モニタリングを行う上で、有効な解析手段となると考えられるが、本手法の注意点についてここで指摘しておきたい。本研究では、海底表層泥のみをサンプリングする採泥器を用いたり、DNA 抽出時、堆積物と同時に採取された海水を極力減らしたりすることで栄養細胞の断片の混入を防いだが、栄養細胞由来の断片 (DNA) が堆積物中に残存する可能性は、完全には否定しきれない。今後は、シスト壁に覆われ保護されたシストの性質を利用し、DNA 抽出前の堆積物サンプルに、DNAase を用いて栄養細胞断片やシスト断片由来の DNA を分解する処理を行う必要もある。

また、本研究で解析した堆積物量、サンプリング地点数ともにごく限られたものである。検出精度を高め、東京湾全体の *C. marina* 集団のシスト存在量を把握するためには、より多くの処理量、サンプル数で詳細な解析を行うことも重要である。

謝辞

本研究の一部は、国立環境研究所の奨励研究、環境省地球環境研究総合推進費 (D-4, D-72) によって行われた。東京湾調査にあたっては、千葉県水質調査船「きよすみ」乗務員の方々のご協力をいただいた。感謝申し上げます。

引用文献

- Bowers, H. A., Tomas, C., Tengs, T., Kempton, J. W., Lewitus, A. J. & Oldach, D. W. 2006. Raphidophyceae [Chadefaud ex Silva] systematics and rapid identification: sequence analyses and real-time PCR assays. *J. Phycol.* 42: 1333–1348.
- Delaney, J. A., Ulrich, R. M. & Paul, J. H. 2011. Detection of the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* using the RuBioCO small subunit (*rbcS*) gene in two real-time RNA amplification formats. *Harmful Algae* 11: 54–64.
- 出村幹英・河地正伸 2012. アオコ・赤潮を形成する藻類・有毒性微細藻類「ラフィド藻類」. 渡邊信 (監修). 藻類ハンドブック. pp. 408–412. (株) エヌ・ティー・エス. 東京.
- Demura, M., Nakayama, T., Kasai, F. & Kawachi, M. 2014. Genetic structure analysis of local Japanese populations of *Chattonella marina* var. *antiqua* and *C. marina* var. *marina* by microsatellite markers. *Phycol. Res.* 62:

- 102–108.
- Demura, M., Noël, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M. M. & Kawachi, M. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characters and genetic diversity. *Phycologia* 48: 518–535.
- Demura, M., Noël, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M. M. & Kawachi, M. 2012. Life cycle of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) inferred from analysis of microsatellite marker genotypes. *Phycol. Res.* 60: 316–325.
- 濱田隆士 1993. 最北限の造礁サンゴ群落. 地学雑誌 102: Plate 3 – Plate 4.
- 飯村晃・横山智子・小林広茂 2013. 赤潮等プランクトン調査. 千葉県環境研究センター平成 25 年度年報 (7) (<http://www.pref.chiba.lg.jp/wit/suishitsu/report/documents/ar2013suishitsu007.pdf>)
- 今井一郎 1990. 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西海区水産研究所研究報告 23: 63–166.
- 今井一郎・板倉茂・大内晟 1993. 北部広島湾における *Chattonella* 赤潮の発生と海底泥中のシストの挙動. 日本水産学会誌 59: 1–6.
- 今井一郎・伊藤克彦 1986. 周防灘海底泥から見出された *Chattonella* のシストについて (予報). 日本プランクトン学会報 33: 61–63.
- 神奈川県水産技術センター資源環境部 2009. 有害赤潮プランクトンの発生確認と漁業被害の低減 (<http://www.agri-kanagawa.jp/seika/pdf/4415.pdf>).
- Kamikawa, R., Asai, J., Miyahara, T., Murata, K., Oyama, K., Yoshimatsu, S., Yoshida, T. & Sako, Y. 2006. Application of a Real-Time PCR assay to a comprehensive method of monitoring harmful algae. *Microbes Environ.* 21: 163–173.
- Nakamura, Y. & Umemori, T. 1991. Encystment of the red tide flagellate *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae): cyst yield in batch cultures and cyst flux in the field. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 78: 273–284.
- Nakamura, Y., Umemori, T., Watanabe, M., Kulis, D. M. & Anderson, D. M. 1990. Encystment of *Chattonella antiqua* in laboratory cultures. *J. Oceanogr. Soc. Jpn* 46: 35–43.
- Nakane, T., Nakaka, K., Bouman, H. & Platt, T. 2008. Environmental control of short-term variation in the plankton community of inner Tokyo Bay, Japan. *Estuar. Coast. Shelf S.* 78: 796–810.
- 野村英明 1988. 1900 年代における東京湾の赤潮と植物プランクトン群集の変遷. 海の研究. 7: 159–178.
- 岡市友利 1997. “赤潮現象”. 赤潮の科学 第二版 (岡市友年編), pp. 5–41. 恒星社厚生閣. 東京.
- 岡市友利・本城凡夫・福代康夫 1997. “赤潮種と発生環境”. 赤潮の科学 第二版 (岡市友年編), pp. 247–291. 恒星社厚生閣. 東京.
- 大山憲一・松岡聡・本田恵二・吉松定昭 2006. 播磨灘南西部における *Chattonella* (Raphidophyceae) のシスト密度と赤潮発生との関係. 香川県赤潮研究所研究報告 5: 11–21.
- Strivastava, A., Choi, G.-G., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., Ravi, A. K. & Asthana, R. K. 2012. Dynamics of microcystin production and quantification of potentially toxigenic *Microcystis* sp. using real-time PCR. *Water Res.* 46: 817–827.
- 水産庁九州漁業調整事務所 2010. 平成 21 年九州海域の赤潮. pp. 67–95.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 2009. 平成 20 年瀬戸内海の赤潮. pp. 1–12.
- Veron, J. E. N. 1992. Conservation of biodiversity: a critical time for the hermatypic corals of Japan. *Coral Reefs* 11: 13–21.
- Yamaguchi, M. & Imai, I. 1994. A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia* 33: 163–170.

(Received Sep. 23, 2014; Accepted Jun. 29, 2015)