

令和4年度 南北海道学術振興財団 成果報告書
北海道で発生した大規模赤潮の原因藻類 *Karenia selliformis* の毒性成分の同定
(共同研究)

北海道大学大学院水産科学院 藤田雅紀

1. 背景と目的

2021年秋期に道東沿岸部で発生した赤潮 (Harmful Algal Bloom, HAB) はサケやウニの大量斃死を引き起こし、その被害額は数十億に上るとされている。当該赤潮から優占種として分離・同定された *Karenia selliformis* は、世界各地の HAB において検出されており、特にニュージーランド株ではその毒成分としてギムノジミン類が報告されている。しかし、我々の予備的検討からは今回の北海道株からはギムノジミンの産生は認められず、未知の毒性分を産生することが示唆された。そこで本研究では水産物への毒蓄積のモニタリングと安全性の検証方法、また合理的な耐性品種の育種法の確立を目標に、まずはその毒成分の精製と同定を目的とした。

2. 材料と方法

K. selliformis は国立環境研究所の NIES-4541 株を用いた。IMK/2 を用いて、12L:12D、 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 15°C の条件のもと本株の培養を行った。毒性試験においては、シオミズツボウムシとムラサキウニ幼生を対象として、それぞれの 10 個体を滅菌海水 $50 \mu\text{l}$ に分注し、各種試験液 $50 \mu\text{l}$ を添加し、24h、48h 時点での遊泳阻害、形態異常について観察することでその評価を行った。

K. selliformis NIES-4541 株培養液を遠心分離した後に細胞画分については各種有機溶媒にて抽出を行い、上清については C18 固相抽出を行った。それらの混合物を C18 オープンカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC にて分画し、得られた画分に対し毒性試験、各種機器分析を行った。

3. 結果

各種培養条件を検討した結果、上記培養条件のもと安定的な培養が可能になった。*K. selliformis* 生細胞をウニ幼生およびワムシに作用させたところ、それぞれ形態異常・遊泳阻害活性を示したことから、抽出物の活性試験においてもそれらを指標とすることとした。

K. selliformis (100 mL) を 1 か月間培養し、沈殿および上清の抽出物をそれぞれ活性試験したところ、いずれにも活性が認められた (図 1)。それらを合一し、C18 オープンカラムクロマトグラフィーにてイソプロパノール 40 から 100% で分画したところ、最初の二つに活性が認められた。さらに活性画分を C8 カラムを用いた逆相クロマトグラフィーで 10 分ごとに分画したところ、20-30 分画分 (Frc1-3) が活性を示した。さらに本画分を同一条件で 2 分毎に分画したところ 26-28 分画分 (Frc2-5) に活性を検出した (図 2)。

この時点で既に精確な重量測定困難な量であり、NMR データからは候補となるシグナルは見いだせなかった。また、LCMS データからは *K. selliformis* から報告されている Gymnodimine 類および同属から報告されている Brevetoxin 類と一致する質量は検出されず、 m/z 600–800 に複数のシグナルが検出されている。

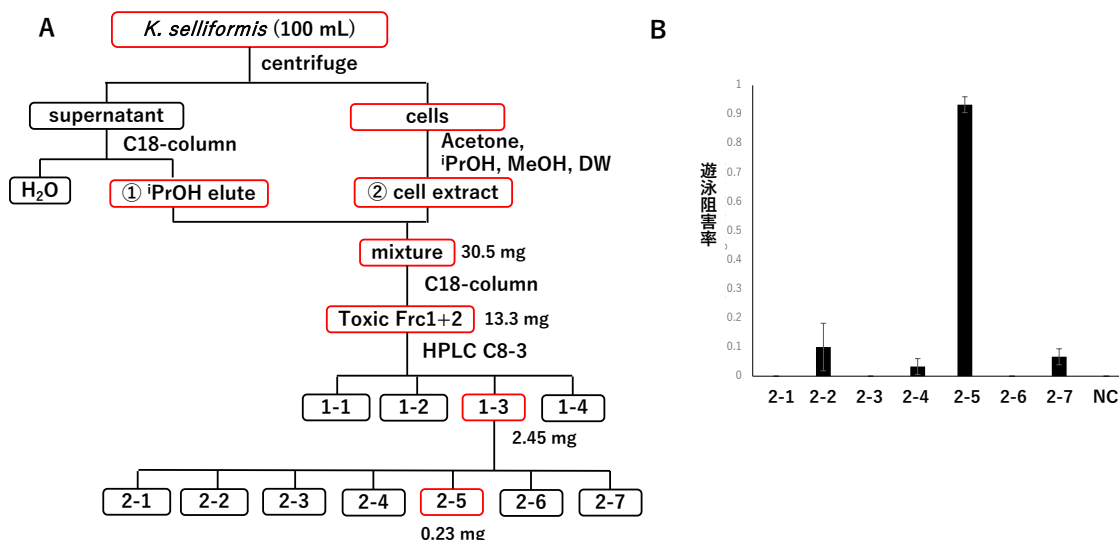


図 1. A) *K. selliformis* からの活性成分の精製スキーム。赤は活性を確認した画分。B) 2 回目の逆相 HPLC 画分のアッセイ結果。

4. 考察

本研究では毒性試験方法の確立、活性を指標にした毒性成分の精製について検討した。シオミズツボワムシを用いた毒性試験では精製が進んだ画分においても有意差を示す活性が見られたことより、その有用性が確認された。クロマトグラフィーの挙動から、ワムシに対して活性を示す毒性物質は固相抽出で安定して抽出可能な脂溶性物質であり、少なくとも主要な物質は単一であると推測された。これは渦鞭毛藻由来のポリエーテル化合物などと同様の性質であり、関連が推測される。今後は、毒素産生条件、および大規模培養条件の検討を進めて、活性物質の取得と構造決定を進める予定である。

5. 参考文献

1. Mitsunori Iwataki, et al. Morphological variation and phylogeny of *Karenia selliformis* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in an intensive cold-water algal bloom in eastern Hokkaido, Japan in September–November 2021. *Harmful Algae* **2021**, *114*, 102204.
2. Christopher O. Miles, et al. Gymnodimine C, an Isomer of Gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, (16), 4838-4840.
3. Douglas Mountfort, et al. Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, *Karenia selliformis*. *Harmful Algae* **2006**, *5*, (6), 658-664.