

Ribalet, F., J. A. Berges, A. Inaora and R. Casotti (2007)  
Growth inhibition of cultured marine phytoplankton  
by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes  
*Aquat Toxicol.* **85**: 219-227.

藻類由来の有毒多価不飽和アルデヒドによる海洋植物プランクトンの増殖阻害

海洋植物プランクトンでは、細胞膜が壊れた直後に多価不飽和脂肪酸が活性化され、これが酵素によって分解されることで多価不飽和アルデヒド (polyunsaturated aldehydes: PUAs) が生成される。生成された PUAs は 2E, 4E/Z-heptadienal, 2E, 4E/Z-octadienal, 2E, 4E/Z-decadienal 等を含んでおり、特に 2E, 4E-decadienal は棘皮動物や多毛類、甲殻類、軟体動物といった無脊椎動物の再生産に有害な影響を引き起こすことが知られている。しかし、他の PUAs や自然環境下における植物プランクトンへの PUAs の影響に関する知見は少ない。本研究では 6 種類の植物プランクトンに 3 種類の PUAs をそれぞれ添加して、植物プランクトンの増殖率、細胞の大きさ、細胞質顆粒、クロロフィル量、形態の変化を観察し、PUAs の影響を検討することを目的とした。

実験に用いた海洋植物プランクトンは、珪藻綱の *Skeletonema marinoi*、緑藻綱の *Dunaliella tertiolecta*、ハプト藻綱プリムネシウム亜綱の *Isochrysis galbana*、渦鞭毛藻綱の *Amphidinium carterae*、プラシノ綱の *Tetraselmis suecica* と *Micromonas pusilla* の 6 種で、これらの無菌株は米国立 Provasoli-Guillard 海洋植物プランクトン培養センターから譲り受けた。培養は、度 15°C (*M. pusilla* のみ 18°C)、明暗周期 12hL: 12hD、光強度 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の条件下で行った。海水はナポリ湾から得たものを使用し、濾過した後に f/2 培地に含まれる栄養塩を添加して培地とした。実験に用いた PUAs は 2E, 4E-heptadienal, 2E, 4E-octadienal, 2E, 4E-decadienal の 3 種類で、Sigma-Aldrich 社より購入した。PUAs の有毒性を調べるために、対数増殖期の植物プランクトンの培養に、0.1-36  $\mu\text{mol L}^{-1}$  の範囲の濃度を数段階用意して PUAs を添加し、フローサイトメトリーを用いて実験開始直前と 24 時間後の細胞数を計数し、増殖率と 50% 効果濃度 (PUAs の添加から 24 時間後にコントロール区と比べて 50% の死滅を示す PUAs の濃度: EC<sub>50</sub> 濃度) を算出した。この実験を行うにあたり、生細胞と死細胞を区別するため、原形質膜が機能しない細胞のみ染色する判定試薬 SYTOX Green を使用した。また、PUAs の濃度調節は室温下で 100% メタノールで薄めて行い、実験開始前に波長 274 nm の吸光度から濃度を算出した。フローサイトメトリーは生細胞数の計数に加え、散乱や蛍光といった細胞の光学的な特性から、前方散乱光 (FALS) で細胞の大きさを測定し、側方散乱光 (RALS) で細胞質顆粒の量を測定し、赤色蛍光を使用しクロロフィル量の相対値を測定した。PUAs 添加による形態の変化を観察するために、落射蛍光顕微鏡を用いて検鏡観察を行った。核の形態観察には、EC<sub>50</sub> 濃度の 2 倍濃度の PUAs が添加された培地で 24 時間と 48 時間培養した細胞を用い、1% のパラホルムアルデヒドで固定し、SYBR Green I で染色した細胞を観察して行った。

PUAs の培地への添加実験では、濃度依存的な増殖率の低下が全ての種で観察された。また、本実験に用いた 3 種の PUAs の中でも 2E, 4E-decadienal が増殖率に対して最も強い効果を引き起こすことが明らかになった。藻類の種類によって添加した PUAs への感受性が異なり、*I. galbana* の EC<sub>50</sub> 濃度が 2E, 4E-decadienal で 0.99  $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、2E, 4E-octadienal で 2.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、2E, 4E-heptadienal で 5.90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  であったのに対し、*T. suecica* と *S. marinoi* の EC<sub>50</sub> 濃度は *I. galbana* の場合の 2-3 倍程であった。PUAs 添加による細胞の大きさの変化をフローサイトメトリーの前方散乱分析で調べたところ、*M. pusilla* 以外の種で細胞の大きさの減少が観察された。また、RALS の照射により、*A. carterae* 以外の種で細胞質顆粒の増大が認められ、赤色蛍光の検出により、全ての種でクロロフィル量の減少が確認された。落射蛍光顕微鏡を用いた検鏡の結果、PUAs の添加による細胞核の変形やクロマチンの破碎、DNA の変質が全ての種で確認され、また SYTOX Green 染色と観察で、PUAs の添加による生細胞の減少も確認された。

今回の実験で 2E, 4E-decadienal が最も強い効果を引き起こすことが判明した。理由として、アルキル基が長く、分子の反応度が大きいことが考えられた。また、植物プランクトンの種類により PUAs への感受性に差があったが、これは各植物プランクトンの細胞の体積当たりの表面積の割合や細胞壁の特性等に起因していると考えられた。本実験に用いられた PUAs の濃度は植物プランクトンの増殖や生残に影響を与える重要な濃度範囲であるため、実際の自然環境下でも、PUAs がプランクトン間の相互関係を取り持つアレロケミカルとして働いている可能性が示唆された。

横溝 岳志