

赤潮プランクトン3種の有機態リン利用特性と アルカリフォスファターゼ産生能

山口晴生,¹ 西島敏隆,^{2*} 西谷博和,^{2a} 深見公雄,² 足立真佐雄²

(2003年2月10日受付, 2003年9月24日受理)

¹愛媛大学大学院連合農学研究科, ²高知大学農学部

Organic phosphorus utilization and alkaline phosphatase
production of 3 red tide phytoplankton

HARUO YAMAGUCHI,¹ TOSHITAKA NISHIJIMA,^{2*} HIROKAZU NISHITANI,^{2a}
KIMIO FUKAMI² AND MASAO ADACHI²

¹United Graduate School of Agricultural Science, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-0905, ²Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

In eutrophic coastal environments in Japan, red tides have caused mass mortality of cultured and wild fish. It is known that the concentration of organic phosphorus is usually higher than that of inorganic phosphorus in such seawaters, and that many phytoplankton produce alkaline phosphatase (AP). To elucidate the contribution of organic phosphorus to the growth of red tide phytoplankton, organic phosphorus utilization and AP production of *Karenia mikimotoi*, *Skeletonema costatum* and *Heterosigma akashiwo* were examined. *K. mikimotoi* and *S. costatum* used organic phosphorus compounds (phosphomonoesters, ADP, and ATP) as a sole phosphorus source. These phytoplankton produced AP under orthophosphate concentration of less than 0.2 and 0.25 μM , respectively, and their AP activities were 115 and 0.273 fmol/cell/min, respectively. It was shown that these phytoplankton have sufficient potential AP activity necessary for the uptake of phosphorus to maintain saturated growth. On the other hand, *H. akashiwo* used ADP and ATP, but not phosphomonoesters, as phosphorus sources; AP production was not found. It is suggested that organic phosphorus contributes to the outbreaks of red tide in eutrophic coastal seawaters.

キーワード : *Karenia mikimotoi*, *Skeletonema costatum*, *Heterosigma akashiwo*, 赤潮プランクトン, 有機態リン, アルカリフォスファターゼ

富栄養化が進行した日本の沿岸・内海域では、赤潮による漁業被害が頻発し、その防除対策が緊急の課題となっている。赤潮の発生防除や予知技術の確立には、赤潮発生機構に関する知見が必須であり、窒素・リン¹⁻³⁾およびビタミン類など^{4,5)}赤潮プランクトンの増殖に関わる必須栄養物質について、その要求に関する増殖速度論的解析が進められてきた。このうちリンに関しては、赤潮プランクトンを含む多くの植物プランクトンがアルカリフォスファターゼ (AP) 産生能を有することが明らかにされ、⁶⁻⁸⁾ これらはオルトリン酸塩だけでなく有機態リンをもリン源として利用可能であるにも拘わらず、

赤潮発生の予察や防除対策にはもっぱら無機態リン (オルトリン酸塩) のみが重要視されてきている。

赤潮多発海域は、各種廃水の流入によって富栄養化が進行した水域であり、これらの海水中には、多くの場合、無機態リンを上回る有機態リンが含まれることが知られ、^{9,10)} しかも、近年では廃水中のリン削減によって沿岸海水中の N:P 比が増大し、^{11,12)} 赤潮プランクトンの増殖が窒素よりもリンによって制限される傾向が強くなっている。したがって、赤潮プランクトンの有機態リン利用能は、有機汚濁海域における赤潮プランクトンの増殖と赤潮への発達のみならず、リン源をめぐるプラン

* Tel : 81-88-864-5149. Fax : 81-88-864-5197. Email : nisijima@cc.kochi-u.ac.jp

^a 現所属 : 榊建設環境研究所 (Civil Engineering and Eco-Technology Consultants Co., Ltd, Toyoshima, Tokyo 170-0013, Japan)

クトン相互の競合を介して, 多様なプランクトン種の中から特定種が優占する過程にも寄与している可能性が高い。

そこで, 本研究では日本の沿岸域で多発する赤潮原因種 3 種について, 有機態リンの利用能を明らかにするとともに, 有機態リン利用に関わる酵素として知られるアルカリフォスファターゼ (AP) の産生能について, その詳細を明らかにしようとした。

試料および方法

供試生物 日本の沿岸域で多発する赤潮の原因種 *Karenia mikimotoi* (= *Gymnodinium mikimotoi*) ax-2 株 (渦鞭毛藻), *Skeletonema costatum* NIES-324 株 (珪藻), および *Heterosigma akashiwo* NIES-5 株 (ラフィド藻) の, いずれも無菌クローン株を試験に用いた。*K. mikimotoi* ax-2 株は山口峰生氏 (瀬戸内水研) から, 後 2 種は国立環境研究所から譲受した。

培養および計数 *K. mikimotoi* のリン化合物利用能試験にはセレン (Na_2SeO_3) を最終濃度 15 nM になるように添加した SWMⅢ培地,⁵⁾ AP 産生能試験にはセレン (Na_2SeO_3) を最終濃度 17 nM になるように添加した人工海水培地¹³⁾ (天然海水 1 % 含む), その他の 2 種にはいずれの試験にも ASP_2 NTA 培地¹⁴⁾ を基礎培地として用い, 目的に応じてオルトリン酸塩含有または不含に調製して用いた。培養は水温 20°C, 照度 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, L : D = 14 hr : 10 hr の明暗サイクルで行い, 細胞数は検鏡による直接計数, クロロフィル *a* 量は Turner Designs 10-AU Fluorometer (Sunnyvale CA, USA) により求めた。

リン化合物利用能試験 リン化合物利用能は, 無機リン化合物 3 種および有機リン化合物 11 種 (Table 1)

Table 1 List of phosphorus compounds used for this test

| Symbol | Chemical name |
|--------|--|
| GMP | Guanosin-5'-monophosphate disodium salt |
| CMP | Cytidine-2' (3')-monophosphate |
| UMP | Uridine-5'-monophosphate disodium Salt |
| AMP | Adenosine-5'-monophosphate sodium salt • 2H ₂ O |
| ADP | Adenosine-5'-diphosphate disodium salt |
| ATP | Adenosine-5'-triphosphate disodium salt • 3H ₂ O |
| G1P | α -D-Glucose-1-phosphate dipotassium salt • 2H ₂ O |
| G6P | D-Glucose-6-phosphate disodium salt |
| F6P | D-Fluctose-6-phosphate disodium salt |
| NPP | <i>p</i> -Nitrophenylphosphoric acid disodium salt |
| GYP | β -Glycerophosphoric acid disodium Salt • 5H ₂ O |
| MP | Sodium metaphosphate |
| PP | Sodium diphosphate • 10H ₂ O |
| TPP | Sodium tripolyphosphate |
| PO4 | Disodium hydrogenphosphate |

について, これらを唯一のリン源として濾過滅菌により最終濃度 25 μM となるように調製した試験用培地で試験藻を培養し, その増殖の有無によって判定した。試験培養では, 予めリン不含培地で 8~17 日間飢餓培養した試験藻をオルトリン酸塩含有培地, リン不含培地および利用能試験培地に接種して定常期まで培養し, 経時的にクロロフィル *a* 量を測定してその最大収量を求めた。リン化合物の利用能は, 各リン化合物による収量をオルトリン酸塩培地による収量に対する比として表した。なお, 接種に伴うリンの持ち込み量を最小限にし, かつ増殖能を有するように, 試験培養時の初期細胞密度を *K. mikimotoi* では 1,000 cells/mL, *H. akashiwo* では 2,000 cells/mL, *S. costatum* では 5,000 cells/mL とした。

アルカリフォスファターゼ産生能試験 試験培養では, 予めオルトリン酸塩含有培地で 10~14 日間培養した試験藻をオルトリン酸塩含有培地およびリン不含培地で培養して, 一定期間ごとに培養液を採取し, 細胞密度, アルカリフォスファターゼ (AP) 活性および培地中のオルトリン酸塩濃度を測定した。オルトリン酸塩含有培地の初期オルトリン酸塩濃度は, *K. mikimotoi* では 42.1 μM , *S. costatum* では 38.7 μM , *H. akashiwo* では 22.5 μM になるように調整した。試験藻の AP 活性は, トリス緩衝液 (pH 9.0) および基質としてフェニルリン酸を最終濃度がそれぞれ 0.5 M および約 1.64 mM になるように試料に添加して, 25°C で 12~24 時間培養し, 遊離した培地中のフェノールを比色定量する方法¹⁵⁾ により求めた。なお, フェノール定量時に細胞を破碎したものと非破碎の試料を遠心分離し, 得られた上清中のフェノール量を測定したところ, 両者に有意な差は認められなかったことから, 本法では細胞内にフェノールが残存する可能性はないとみなした。採取した藻体を含む全培養液と孔径 0.8 μm Nuclepore Filter で重力濾過した濾過培養液について AP 活性を測定し, 濾過培養液の活性を細胞外に遊離した活性, 全培養液の活性から濾過培養液の活性を差し引いた値を藻細胞に保持された活性とした。さらに, 藻細胞に保持された活性を細胞密度で割ったものを, 細胞当たりの活性として換算した。なお, 重力濾過により藻細胞が破碎されていないことは処理ごとに検鏡により確認した。

培地中のリン酸塩の測定 試験培養液中に残存するリン酸塩濃度はモリブデンブルー法^{16,17)} に準じる比色定量法, あるいはオートアナライザー TRAACS 800 (BRAN+LUEBBE) を用いて定量した。

結 果

リン化合物利用能 試験藻 3 種の各種リン化合物の利用能は Fig. 1 に示されている。ここで利用能は, それぞれリン化合物をリン源として培養して得られた最大

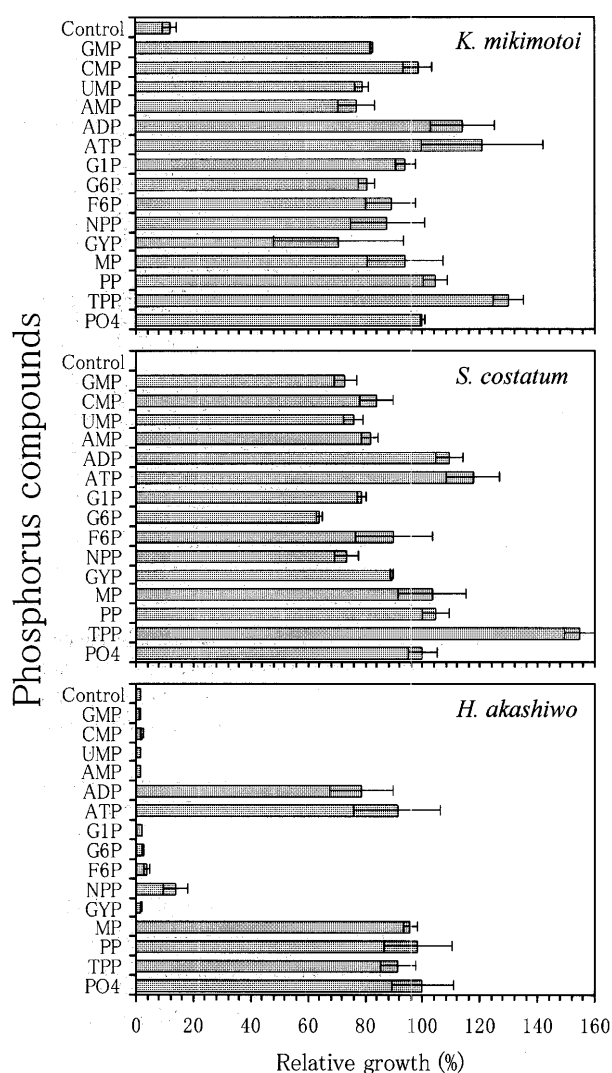


Fig. 1 Relative growth (%) of red tide phytoplankton with various phosphorus compounds. 100% growth was obtained with orthophosphate. Symbols of phosphorus compounds are noted in Table 1. Control represents no addition of phosphorus compounds in the medium. Bars show the range of duplicate determinations.

細胞収量と、オルトリン酸塩をリン源とした場合の最大収量との比で表されている。

まず、3種の赤潮プランクトンは、いずれも試験した無機リン化合物3種、すなわちトリポリリン酸 (TPP)、ピロリン酸 (PP) およびメタリン酸 (MP) をリン源として利用した。このうち *K. mikimotoi* と *S. costatum* では、PP および MP による最大収量はオルトリン酸塩をリン源とした場合と大差がなかったが、TPP による最大収量がオルトリン酸塩の場合より高く、それぞれオルトリン酸塩の約 1.3 倍および 1.5 倍に達した。一方 *H. akashiwo* の最大収量は、前述した3種の無機リン化合物いずれにおいても、オルトリン酸塩の

場合と大きな差が認められず、その収量はオルトリン酸塩の 91.6~98.3% であった。

次に有機リン化合物の利用能をみると、*K. mikimotoi* と *S. costatum* は、試験に用いた全ての有機リン化合物、リン酸モノエステル (9種)、アデノシン二リン酸 (ADP) およびアデノシン三リン酸 (ATP) を利用した。これら有機リン化合物による *K. mikimotoi* および *S. costatum* の最大収量は、オルトリン酸塩のそれぞれ 73.1~118% および 70.8~121% であり、両種とも ADP および ATP による最大収量がオルトリン酸塩によるそれを超えた。一方、*H. akashiwo* はリン酸モノエステル (9種) をリン源として利用できず、ADP および ATP を利用した。しかし ADP および ATP による最大収量はオルトリン酸塩による収量の 80~92% 程度であり、上記2種の場合に比べてかなり低かった。

***K. mikimotoi* の AP 産生** *K. mikimotoi* の培養に伴う細胞密度、AP 活性および培地中のオルトリン酸塩濃度の変動は Fig. 2 に示されている。本種の細胞密度は、オルトリン酸塩含有培地において、培養開始6日目に3日目と同程度の細胞数を維持し、その後24日目まで増加した。それに伴って培地中のオルトリン酸塩濃度が12日目以降急減し、培養24日目には $0.60 \mu\text{M}$ にまで減少した (Fig. 2A)。オルトリン酸塩含有培養では、藻体を含む全培養液中に AP 活性は全く検出されなかった。

一方リン不含培地では、細胞密度は培養12日目まで増加してこの頃に定常期に達し、その後は培養24日目まで細胞数に大きな変動が見られなかった (Fig. 2B)。培地中のオルトリン酸塩濃度は培養6日目には $0.2 \mu\text{M}$ 以下になり、培養12日目から培養液中に AP 活性が検出され始め、培養日数の経過に伴って増大した。培養液中の AP 活性を細胞当りに換算すると、培養12日目では $27.3 \text{ fmol/cell/min}$ でやや低かったが、その後増加し、培養24日目にはその約 4.2 倍まで増加し、培養期間中最大の活性を示した。

藻体を含む全培養液中の AP 活性に占める、細胞に保持された活性および細胞外に分泌・排出された活性の割合は Fig. 3 に示されている。これから、本藻の AP 活性はその大部分が細胞に保持されていること、藻体に保持される活性の割合はリン不含培地で 85.5~100% であり、AP 活性が初めて現れた時期 (培養12日目) に高く、その後の培養の経過とともにやや低下することがわかった。

***S. costatum* の AP 産生** *S. costatum* の培養に伴う細胞密度、AP 活性および培地中のオルトリン酸塩濃度の変動は Fig. 4 に示されている。オルトリン酸塩含有培地では、本藻の細胞数は培養開始15日目まで増加し、それに伴って培養液中のオルトリン酸塩濃度は減少

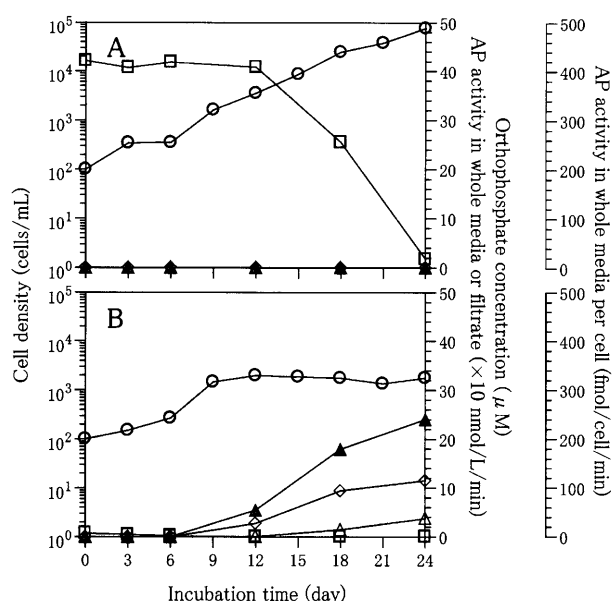


Fig. 2 Changes of cell density, orthophosphate concentration, and AP activity in the culture of *K. mikimotoi* growing in orthophosphate (A) and phosphate-free (B) media. ○, Cell density; □, Orthophosphate concentration; ▲, AP activity in whole media ($\times 10$ nmol/L/min); △, AP activity in filtrate ($\times 10$ nmol/L/min); ◇, AP activity in whole media per cell (fmol/cell/min).

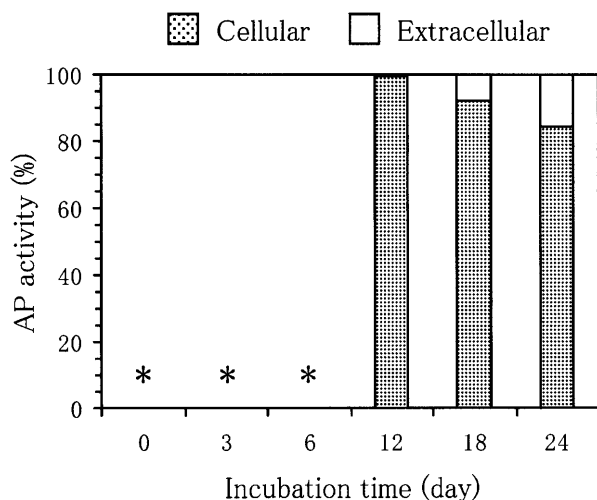


Fig. 3 Distribution of AP activity of *K. mikimotoi* growing in phosphate-free media. * represents no AP activity detected.

し、培養24日目には検出されなくなった (Fig. 4A)。培養液中のAP活性はオルトリン酸塩濃度が高い培養初期には検出されなかったが、培養液中のオルトリン酸塩が $0.25 \mu\text{M}$ にまで低下した培養18日目から活性が現れ、培養24日目まではほぼ一定の値を示した。

リン不含培地では培養9日目まで細胞密度は増加

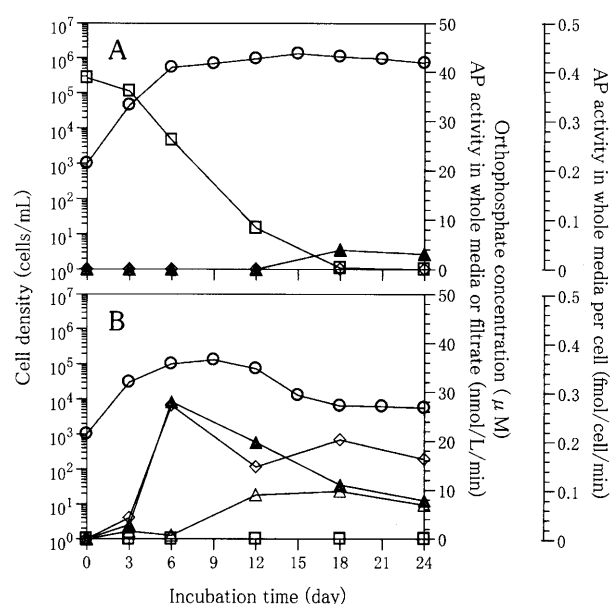


Fig. 4 Changes of cell density, orthophosphate concentration, and AP activity in the culture of *S. costatum* growing in orthophosphate (A) and phosphate-free (B) media. ○, Cell density; □, Orthophosphate concentration; ▲, AP activity in whole media (nmol/L/min); △, AP activity in filtrate (nmol/L/min); ◇, AP activity in whole media per cell (fmol/cell/min).

し、その後減少した (Fig. 4B)。培養期間中、培地中のオルトリン酸塩はほとんど検出されず ($0.2 \mu\text{M}$ 以下)、本種のAP活性は培養3日目にはじめて検出され (0.043 fmol/cell/min)、その後増加し、培養6日目におけるAP活性は 0.273 fmol/cell/min に増加し、培養期間中最大の活性を示した。

藻体を含む全培養液中のAP活性に占める、細胞に保持された活性および細胞外に分泌・排出された活性の割合は Fig. 5 に示されている。オルトリン酸塩含有培地では、全て細胞外に分泌・排出された活性で占められ (Fig. 5A)、リン不含培地では、細胞に保持されたAP活性の割合は、培養3日目を除き、培養日数の経過に伴い 97.4% から 11.8% に減少した (Fig. 5B)。

H. akashiwo の AP 産生 *H. akashiwo* の培養に伴う細胞密度、オルトリン酸塩濃度および全培養液中のAP活性の経時変化を Fig. 6 に示す。オルトリン酸塩含有培地では培養15日頃に定常期に達し、細胞数の増加と対応して培地中のオルトリン酸塩濃度も減少した (Fig. 6A)。オルトリン酸塩は18日目には殆ど検出されなくなった。一方オルトリン酸塩不含培地では、培養の全期間を通してオルトリン酸塩は検出されなかったが、細胞数は培養6日目ごろまで増加し、その後は定常期が長期間維持された (Fig. 6B)。

全培養液中のAP活性は、オルトリン酸塩含有・不含の両培養条件で、培養の全期間を通して全く検出されな

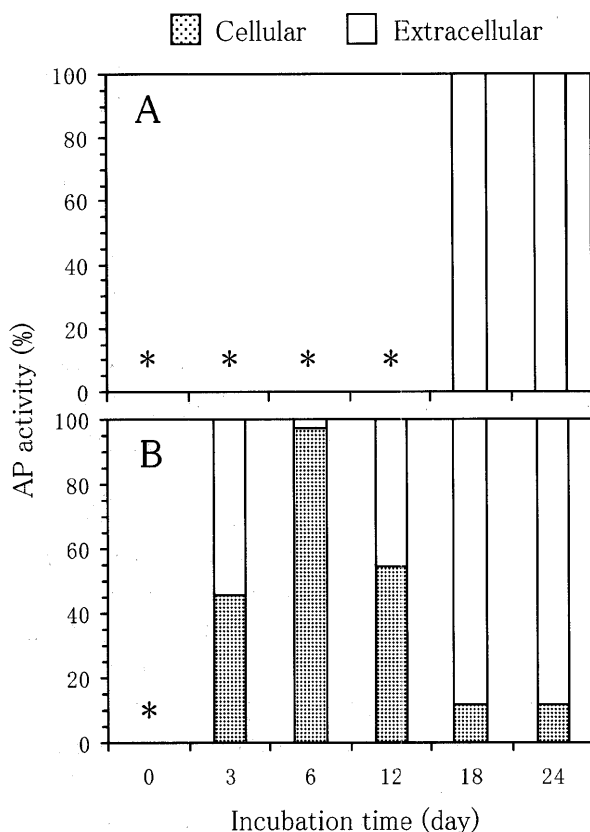


Fig. 5 Distribution of AP activity of *S. costatum* growing in orthophosphate (A) and phosphate-free (B) media. * represents no AP activity detected.

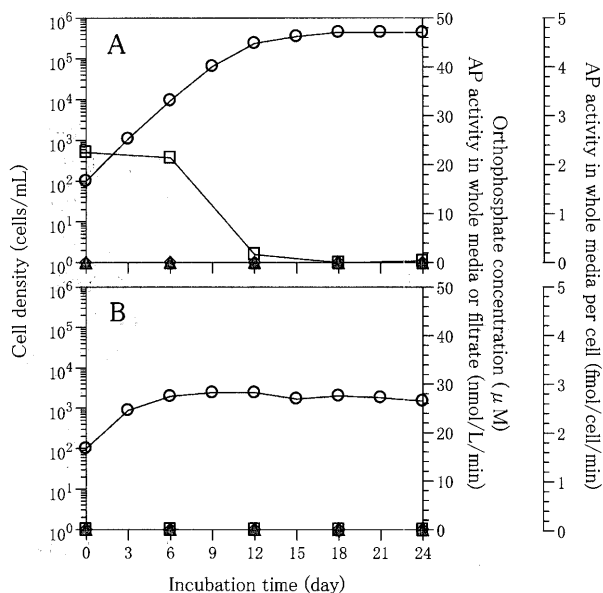


Fig. 6 Changes of cell density, orthophosphate concentration, and AP activity in the culture of *H. akashiwo* growing in orthophosphate (A) and phosphate-free (B) media. ○, Cell density; □, Orthophosphate concentration; ▲, AP activity in whole media (nmol/L/min); △, AP activity in filtrate (nmol/L/min); ◇, AP activity in whole media per cell (fmol/cell/min).

かった。このことは、*H. akashiwo* はオルトリン酸塩が枯渇した状態でも AP を産生しないことを示している。

考 察

本試験の結果、まず無機リン化合物の利用能をみると、*K. mikimotoi*, *S. costatum* および *H. akashiwo* はオルトリン酸塩の他、トリポリリン酸 (TPP), ピロリン酸 (PP) およびメタリン酸 (MP) の無機リン化合物をリン源として利用することがわかった。これら無機リン化合物のリン源としての利用能は *K. mikimotoi*²⁾ および *S. costatum*¹⁸⁾ を含む他の赤潮プランクトン、*Chaetoceros didymum* var. *protuberans*, *Ditylum brightwellii*, *Chattonella antiqua* および *Chattonella marina* でもみられ、¹⁸⁾ このことから、TPP, PP および MP のリン源としての利用能は少なくとも赤潮プランクトンにかなり一般的であると考えられる。

また、最大細胞収量を指標としたこれら無機リン化合物のリン源としての利用能は、試験した3種の赤潮プランクトンとも PP および MP では、現場海域でリン源として最も一般的と考えられるオルトリン酸塩の場合と遜色はなかった。しかし、TPP のリン源としての利用能は種によって異なり、*K. mikimotoi* と *S. costatum* では TPP による最大収量がオルトリン酸塩によるそれよりかなり高かった。さらにこれら2種では、ADP および ATP をリン源とした場合も、オルトリン酸塩による細胞収量を上回った。リン源の種類によって最大細胞収量が異なる例は他種でもみられ、*C. marina* の最大収量が PP, MP, ADP および ATP をリン源とした場合、オルトリン酸塩のそれより大きくなることが報告されている。¹⁸⁾ このように植物プランクトンが最も一般的にリン源としているオルトリン酸塩の場合より、他のリン化合物の場合に最大収量が増大する現象がどのような機構で起こるのかは、未だ明らかにされていない。

本試験の結果、有機リン化合物のリン源としての利用能はプランクトンの種によって相当異なり、*K. mikimotoi* および *S. costatum* がリン酸モノエステルをリン源として利用するのに対して、*H. akashiwo* はリン酸モノエステルを利用しないことがわかった。本試験で得られた *K. mikimotoi* の有機態リン利用能は Yamaguchi, Itakura²⁾ の結果とほぼ一致するものであり、また、*H. akashiwo* については、試験に用いられたリン化合物の種類が少ないため詳細な比較はできないが、Watanabe *et al.*¹⁹⁾ のグリセロリン酸 (GYP) を利用できないという点で一致している。リン酸モノエステルをリン源として利用できない種として *C. antiqua* および *C. marina* があり、これらは本試験で得られた *H. akashiwo* の結果と同様に、ADP および ATP をリン源として利用することが知られている。¹⁸⁾ このことから、赤潮プランクト

ンの中にはリン酸モノエステル利用能を有する種と有さない種があり, ADP (二リン酸エステル) および ATP (三リン酸エステル) の利用能は, 広く植物プランクトンが有する能力と考えられる。なお, *H. akashiwo* (本試験株とは別株) は GYP およびグアノシンーリン酸 (GMP) を利用するとの報告,²⁰⁾ また, *S. costatum* (本試験株とは別株) についてはリン酸モノエステルを利用しないとの報告¹⁸⁾ があり, 本試験との結果とは異なっているが, この差異が何に起因するかは明確ではない。

海水中に含まれる有機リン酸エステルとして, リン酸モノエステルのほか, リン酸ジエステル^{6,21)} およびリン酸トリエステル^{22,23)} が挙げられる。植物プランクトンがこれらをリン源として利用する場合には, 種々のフォスファターゼにより加水分解し, 遊離したオルトリン酸を利用していると考えられる。これらのリン酸エステルのうち単純リン酸ジエステル化合物の Bis(*p*-nitrophenyl) phosphate については, *K. mikimotoi*, *S. costatum* および *H. akashiwo* の利用能はかなり低く (山口ら未発表), 有機態リンの分解・摂取に対してフォスフォジェンターゼが関与する可能性は低いと考えられる。しかしながら, これら赤潮プランクトンの中には核酸態リン酸ジエステルとして DNA を利用できる種があり (山口ら未発表), その利用に DNase などの酵素群が関与する可能性がある。したがって, 今後, 沿岸海水中における核酸態リン酸ジエステル化合物 (DNA, RNA 等) の分布について検討する必要がある。次に, 沿岸海水中に分布するリン酸トリエステルについては, 検出できない量から, 分子量 180~700 程度のものが最大 0.58 $\mu\text{g/L}$ 程度検出された (大阪湾表層水) との報告がある。^{22,23)} これらの報告から沿岸海水中に存在するリン酸トリエステルは, 多く見積もっても 0.003 μM 程度であり, 溶存態全リンに占める割合はごく小さいと考えられる。さらに, 今のところ本化合物が植物プランクトンのリン源として直接利用されているとの証拠はみつかっていない。したがって, 沿岸海域では赤潮プランクトンが直接利用できるリン源として, リン酸トリエステルが有意に寄与している可能性は極めて低いと考えられる。

本試験の結果では, リン酸モノエステルを利用する *K. mikimotoi* および *S. costatum* が AP 産生能を有するのに対して, リン酸モノエステルを利用しない *H. akashiwo* は AP 産生能を有しない。これらを総合すると, リン酸モノエステルの利用能はアルカリフォスファターゼ産生能に依存していると考えられる。実際, 本試験で用いた *K. mikimotoi* および *S. costatum* がリン酸モノエステルを利用して増殖している時には培養液中から AP 活性が検出されている (山口ら未発表)。また, 先に述べたように, 本試験で得られた *H. akashiwo*, ならびに *C. antiqua* および *C. marina* はリン酸モノエス

テルは利用しないが, ADP (二リン酸エステル) および ATP (三リン酸エステル) を利用することができる。¹⁸⁾ したがって, これらの利用能はそれぞれ ADPase および ATPase によるものと推察される。

一般的に, いくつかの植物プランクトンは無機リン濃度の低下に伴い細胞表面に AP を産生することが知られている。²⁴⁻²⁶⁾ しかしながら, その濃度が赤潮プランクトンの種によってどの程度異なり, その臨界濃度がどのような値に収斂するのかを検討した例はほとんどみられない。本試験によると, *K. mikimotoi* と *S. costatum* は, いずれも培地中のオルトリン酸塩濃度の低下に伴って AP を産生し, その濃度がそれぞれ 0.2 μM および 0.25 μM 以下になった時に産生することがわかった。本試験で得られた *K. mikimotoi* および *S. costatum* の AP 産生に必要なオルトリン酸塩濃度は, *Prorocentrum minimum* の 0.35 μM ,⁸⁾ *Alexandrium tamarense* の 0.43 μM ,²⁷⁾ *Asterionella glacialis* の 0.006 mg-P/L (0.2 μM に相当)⁷⁾ と類似した値であり, これらの種において, その濃度は 0.2~0.4 μM 程度の狭い範囲に収斂していることがわかった (平均 0.29 μM)。一方, *Gymnodinium catenatum* の AP 産生に必要なオルトリン酸塩濃度は 3.3 μM ²⁷⁾ であり, 前述したプランクトン 5 種の濃度と比較すると約 10 倍程度高い。これらのことから, 赤潮プランクトンの AP 産生に必要なオルトリン酸塩濃度の臨界値は種によって異なり, その濃度が 0.2~0.4 μM 程度に収斂するプランクトン群と, *G. catenatum* のような, 数 μM 程度の高濃度に臨界値をもつ群の少なくとも 2 つに分けられることがわかった。

これら赤潮プランクトン群の AP 産生に必要なオルトリン酸塩濃度を, 日本沿岸域におけるオルトリン酸塩濃度と比較してみると, 赤潮が多発している高知県浦ノ内湾におけるその濃度は, 年間を通してみると 0.14~1.17 μM ,²⁸⁾ あるいは 0.00~1.48 μM ²⁹⁾ の範囲であり, 春季から夏季の表層付近におけるオルトリン酸塩濃度は 0.2~0.4 μM の範囲, あるいはそれ以下で推移していることが多い。また, 広島湾においても, 高水温期の表層付近ではほとんど 0.2 μM 以下になることが報告されている。³⁰⁾ したがって, 実際の現場海域においても前述した 2 群の赤潮プランクトンが AP を産生している可能性は高い。

本試験で得られた *K. mikimotoi* と *S. costatum* の最大の AP 活性, すなわち現場海水中に AP の基質が十分存在する場合の活性は, それぞれ 115 および 0.273 fmol/cell/min であり, 両者に 400 倍以上の差が認められた。しかし, これら 2 種は細胞の大きさや, 最小細胞内リン含量が異なる^{2,31)} ことから, AP 活性を細胞当たりの値で評価することは適切ではないと考えられる。しかも, 本研究で明らかにされたように, *K. mikimotoi* の

Table 2 The potential alkaline phosphatase (AP) activity of red tide phytoplankton

| Phytoplankton species | Maximum growth rate (/day) | Minimum cell quota for phosphorus (fmol/cell) | Phosphorus uptake rate for saturated growth rate (A) (fmol/cell/min) | Potential cellular AP activity (B) (fmol/cell/min) | B/A |
|-----------------------|----------------------------|---|--|--|------|
| <i>K. mikimotoi</i> | 0.67 ^a | 250 ^a | 2.21 | 115 | 52.0 |
| <i>S. costatum</i> | 0.71 ^b | 2.5 ^b | 0.023 | 0.273 | 11.7 |

^a: By Yamaguchi, Itakura²⁾ ^b: By Nishijima, Fukami³¹⁾

AP は主に細胞に保持されるのに対し, *S. costatum* の AP は細胞外へ分泌・排出されることから, 赤潮プランクトンの AP は, 一般的に考えられているように必ずしも細胞表面にのみ分布している^{25,26)}のではなく, 種によって AP 産生様式は相当異なると推察される。藻類の有機態リン分解および摂取に対して直接寄与するのは, 細胞に保持される AP であると考えられるため, 有機態リンの分解および摂取に対する AP 活性の寄与を適正に評価するには, 細胞に保持される AP を基に, 増殖に必要なリン量を考慮する必要がある。

Droop^{32,33)} は, 植物プランクトンの増殖速度は細胞内の制限栄養塩含量に依存し, その培養が定常状態であるとき, 両者の関係は次式で表すことができることを明らかにした。

$$\mu = \mu_{\max}(1 - Q_0/Q)$$

ここで, μ は増殖速度, Q は制限栄養塩の細胞内含量, Q_0 は最小細胞内制限栄養塩含量, μ_{\max} は最大増殖速度を表す。そのプランクトンが制限栄養塩について定常状態にある (Q の時間的変化がない) 場合には, μ と Q の積はその増殖速度を維持するのに要する制限栄養塩摂取速度とみなすことができる。そこで, この増殖速度維持に要するリン摂取速度を基に, 試験したプランクトンの AP 活性を評価した。

まず *K. mikimotoi* と *S. costatum* がリンで制限された定常状態で, かつ最大増殖速度の 95% に相当する速度で増殖速度はほぼ飽和しているとみなした場合, この増殖速度を維持するのに要するリン摂取速度は, それぞれ 2.21 および 0.023 fmol / cell / min の値と算出される (Table 2)。これらのリン摂取速度を両種のポテンシャル AP 活性, すなわち両藻の細胞に保持される最大の AP 活性で, かつ基質飽和の条件で有機態リンを分解・摂取した場合の活性と比較すると, 飽和増殖速度を維持するのに要するリン摂取速度に比べて, ポテンシャル AP 活性が, *K. mikimotoi* では 52.0 倍, *S. costatum* では 11.7 倍高いことがわかった (Table 2)。すなわち, 両種の活性に約 5 倍程度の差があり, いずれもポテンシャルとしての AP 活性は極めて高い。このことは, 海水中に AP の基質となる有機態リンが存在すれば, これらの赤潮プランクトンは無機態リン欠乏時に有機態リンを利用して十分に増殖可能であり, AP 産生能を有して

いない種と競合した場合でも, 極めて優位になり得ることを示している。

以上のことから, 赤潮プランクトンの中には有機態リンを増殖に利用できる種があり, その利用能の差異は AP 産生能に依存していること, さらに, 赤潮プランクトンの AP 産生はオルトリン酸塩濃度が低下した時に誘導され, その活性は種によって差異があるものの, ポテンシャル活性は極めて高いことが明らかになった。したがって, 有機態リンは赤潮プランクトンの増殖に対して有意に寄与するだけでなく, 赤潮に至る種の選択・優占過程にも関与している可能性が示唆される。

今後, 赤潮の発生に対する有機態リンの寄与の詳細を明らかにするには, 実際の現場海域における赤潮プランクトンの AP 活性とともに AP の基質となり得る有機態リンの分布・消長等を明らかにする必要がある。

引用文献

- 1) Nakamura Y. Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 1985; **41**: 381-387.
- 2) Yamaguchi M, Itakura S. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 367-373.
- 3) Yamaguchi M, Itakura S, Uchida T. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the 'novel red tide' dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia* 2001; **40**: 313-318.
- 4) 西島敏隆, 畑 幸彦, 山内章三. 赤潮渦鞭毛藻 *Prorocentrum triestinum* の増殖生理. *日水誌* 1989; **55**: 2009-2014.
- 5) Imai I, Itakura S, Matsuyama S, Yamaguchi M. Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 834-835.
- 6) Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part I. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1984; **10**: 317-391.
- 7) 高田文子, 西田政司. *Asterionella glacialis* の有機態窒素・リンの利用能. *生態化学* 1984; **9**: 3-6.
- 8) Dyhrman ST, Palenik B. Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; **65**: 3205-3212.
- 9) 松山幸彦, 内田卓志, 米田 実, 森山貴光. 浦ノ内湾に

- おける新型赤潮プランクトンの消長と環境要因の関係、渦鞭毛藻・ラフィド藻等新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究、平成9年度研報、瀬戸内水研、1998; 45-51.
- 10) 西谷博和. 沿岸汚濁海域における赤潮藻類の有機態窒素・リン利用に関する研究. 修士論文, 高知大学, 高知. 1998.
 - 11) 城 久. 大阪湾の開発と海洋環境の変遷. 沿岸海洋研究ノート 1991; **29**: 3-12.
 - 12) 風呂田利夫, 小倉紀雄, 高田秀重, 山口征矢, 青木浩之, 平井正風, 佐々木克之. 東京湾. 「海洋環境を考える」(日本海洋学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1994; 69-93.
 - 13) Ishimaru T, Takeuchi T, Fukuyo Y, Kodama M. The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds) *Red Tides, Biology, Environmental Science and Toxicology*, Elsevier, New York. 1989; 357-360.
 - 14) Provasoli L, McLaughlin JJA, Droop MR. The development of artificial media for marine algae. *Arch. für Microbiol.* 1957; **25**: 392-428.
 - 15) 田中克正. 水中アルカリフォスファターゼ活性測定方法の検討. 山口県公害センター年報 1984; **9**: 134-139.
 - 16) 日本気象協会. 「海洋観測指針第5号」(気象庁編) 日本気象協会, 東京. 1985; 1-428.
 - 17) Strickland JDH, Parsons TR. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, Ottawa. 1972; 1-310.
 - 18) 山口峰生. 珪藻類における栄養塩の利用特性および *Chattonella* との栄養塩競合. 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究, 5ヶ年の研報. 南西水研, 1994; 77-91.
 - 19) Watanabe MM, Nakamura Y, Mori S, Yamochi S. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* HADA from Osaka Bay, Japan. *Jap. J. Phycol.* 1982; **30**: 279-288.
 - 20) 岩崎英雄, 佐々田 憲. 赤潮鞭毛藻に関する研究-II. 五ヶ所湾に出現した *Heterosigma inlandica* について. 日水誌 1969; **35**: 943-947.
 - 21) Suzumura M, Ishikawa K, Ogawa H. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnol. Oceanogr.* 1998; **43**: 1553-1564.
 - 22) 山田 久. 有機リン酸トリエステル類による水質汚濁と水生生物への影響—総説—. 東海水研報 1987; **123**: 15-30.
 - 23) 福島 実. 有機リン酸トリエステル類の水環境中での動態 ([特集] 有機リン酸トリエステル類による水環境汚染). 水環境学会誌 1996; **19**: 692-699.
 - 24) Rivkin RB, Swift E. Characterization of alkaline phosphatase and organic phosphorus utilization in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Mar. Biol.* 1980; **61**: 1-8.
 - 25) Flynn KJ, Öpik H, Syrett PJ. Localization of the alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase activities of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Gen. Microbiol.* 1986; **132**: 289-298.
 - 26) Dyhrman ST, Palenik BP. The identification and purification of a cell-surface alkaline phosphatase from the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 1997; **33**: 602-612.
 - 27) Oh SJ, Yamamoto T, Kataoka Y, Matsuda O. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fish. Sci.* 2002; **68**: 416-424.
 - 28) 松山幸彦, 内田卓志, 広田仁志, 織田純生, 米田 実, 森山貴光, 北川 衛, 萩田淑彦. 海水中の無機栄養塩および有機物の動態と新型赤潮プランクトン優占化機構の関係. ラフィド藻等による新型赤潮生物の発生機構と予測技術の開発に関する研究, 5ヶ年の研報. 瀬戸内水研, 1999; 61-74.
 - 29) 山口晴生. 赤潮藻類の有機態リン利用に関する生理生態学的研究. 修士論文, 高知大学, 高知. 2001.
 - 30) Itakura S, Yamaguchi M, Yoshida M, Fukuyo Y. The seasonal occurrence of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) vegetative cells in Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 77-86.
 - 31) 西島敏隆, 深見公雄. 海洋性ラフィド藻および珪藻の増殖に及ぼす栄養塩類構成比の影響. 平成4年度栄養塩類構成比変化影響調査報告書, 1993; 2-14.
 - 32) Droop MR. Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 1968; **48**: 689-733.
 - 33) Droop MR. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* 1973; **9**: 264-272.