

諫早湾で発生した赤潮原因プランクトン，ヘテロシグマ・アカシオ (*Heterosigma akashiwo*) の活性酸素産生能に関する研究

山崎 康裕，小田 達也

Generation of superoxide anion by *Heterosigma akashiwo* newly isolated from Isahaya Bay

Yasuhiro YAMASAKI and Tatsuya ODA

A red tide due to *Heterosigma akashiwo* occurred in Isahaya Bay, Kyushu, Japan in 2002. Seawater sample collected from the red tide area was brought to the laboratory, and the clonal culture of *H. akashiwo* was obtained by repeated washing using capillary pipette. Colony formation assay using marine agar medium revealed that this freshly isolated clonal culture of *H. akashiwo* was associated with a number of bacteria. After the treatment with penicillin (100 μ g/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) for 3 days, these bacteria became undetectable. Interestingly, the growth rate of *H. akashiwo* was markedly enhanced after the treatment with antibiotics. These results suggest that the associated bacteria might competitively suppress the growth of *H. akashiwo*. However, no significant differences in the rate of superoxide anion generation were observed between antibiotics treated and untreated *H. akashiwo*. Furthermore, the rate of superoxide anion generation by *H. akashiwo* strain (NIES-6), which was obtained from National Institute for Environmental Studies, Environmental Agency, and cultured under artificial conditions for more than 10 years, was almost same to our freshly isolated *H. akashiwo* strain. Our results suggest that long term culture under the artificial conditions does not affect the ability of *H. akashiwo* to produce superoxide anion, and superoxide anion generated by this plankton may play an important role in its own growth rather than defense against invasion of bacteria.

Key Words: ヘテロシグマ・アカシオ *Heterosigma akashiwo*, スーパーオキシド superoxide anion, 化学発光 chemiluminescence, 諫早湾 Isahaya Bay, 会合バクテリア Associated bacteria, 増殖率 growth rate

有明海においては、現在多くの異変が報告されている。特に、諫早湾干拓事業が始まった時期と前後して諫早湾ではタイラギやアサリ等の漁獲高が大幅に減少し、また、周辺海域では赤潮発生頻度が増加する傾向にある。さらに、2000年の冬期から翌年春期には浮遊性珪藻、リゾソレニア (*Rizosolenia imbricata*) による大規模な赤潮が発生し、養殖ノリに対する著しい色落ちの原因となったとされている。諫早湾での赤潮原因プランクトン種は珪藻類の他、渦鞭毛藻類、ラフィド藻類、クリプト藻類などの植物プランクトン、繊毛虫類の動物プランクトンの報告がある。これまでの赤潮発生に関する長崎県総合水産試験場等の報告によると、潮受け堤防完成後、高来町から小長井町沿岸域北部海域では特に赤潮発生件数が著しく増加し、その大多数は小長井町地先や小長井港であったと記録されている。また、それらの赤潮は比較的富栄養塩化を好む渦鞭毛藻やラフィド藻を原因プランクトン種とすることが特徴的である¹⁾。この様な状況の中で、2002年5月27日に長崎県小長井町沖でヘテロシグマ (*Heterosigma akashiwo*) による赤潮が発生した。その際、小長井漁協の協力により赤

潮海域より *H. akashiwo* を高濃度に含む海水を採水し、当研究室にて採取海水中に存在するプランクトンについて分析した。*H. akashiwo* が大多数を占めていたが、数は少ないものの、珪藻類や動物プランクトン等他の種類のプランクトンが多種混在していた。一般的なクローニングの手法をくりかえすことにより *H. akashiwo* を単離することに成功した。

H. akashiwo は、ラフィド藻綱 (緑色鞭毛藻類) に属し、光合成能力を有する独立栄養型の単細胞植物プランクトンの一種であり、日本近海で発生する代表的な赤潮原因プランクトンとして知られている。細胞の全形は楕円形に近いが、前端は円頭状で後端が細くなる。やや扁平で、細胞の側面に凹部が存在する。体長の1-1.5倍の2本の鞭毛を持ち、海水中を活発に遊泳する。細胞壁は存在せず、細胞表層に柔らかい粘液層 (グリコカリックス) を有する。ヘテロシグマ赤潮は、日本においては養殖ハマチやタイ²⁾、カナダ、チリー³⁾、ニュージーランド⁴⁾ では養殖サケやマス の斃死をもたらすことが報告されている。*H. akashiwo* の培養は比較的容易で、海水に NaNO_3 、 K_2HPO_4 、ビタミン B_1 、 B_6 、 B_{12} 、 EDTA-Fe^{3+} 、

EDTA-Mn²⁺, 場合によっては土壤抽出液を添加した培地にて, pH8.2, 26 °C, 光照射下で増殖し, 4 x 10⁵ cells/ml程に達する。フィールドにおいては, 春から夏にかけて瀬戸内海~九州の沿岸域を中心に海域によっては大量発生し, 細胞密度が10⁵ cells/mlを越えると魚類の斃死が起こる恐れがあるとされている。秋から冬季に水温の低下とともに自然消滅するが, 一部のヘテロシグマは栄養細胞からシストを形成し, 海底に沈む。翌年, 水温の上昇とともに再びシストから栄養細胞が発芽し, 赤潮を形成する。従って, 一度赤潮が発生した海域では, 次の年にも同様な赤潮が発生する可能性があり, 海底堆積物中のシストの分布状況を調査することはヘテロシグマの大量発生を予測する上で重要である。

ヘテロシグマによる赤潮は現在もわが国の他諸外国において頻発しており, 特に1995年鹿児島県錦江湾におけるヘテロシグマ赤潮は, 大被害をもたらした。ヘテロシグマの毒性原因物質に関してはこれまで様々な仮説が提唱されてきたが, 未だ定説を得るに至っていない。

最近の研究から, ヘテロシグマが活性酸素を放出することが見出され, 魚毒性との関連性が示唆されている⁵⁾。ヘテロシグマと同様, ラフィド藻綱に属する, シャットネラ (*Chattonella marina*, *Chattonella antiqua*), オリストディスカス (*Olisthodiscus luteus*), フィブロカプサ (*Fibrocapsa japonica*) の活性酸素産生が確認されていることから, 活性酸素産生はラフィド藻類に共通した生化学的性質と考えられる⁶⁾。これまで本研究室では主に, *C. marina*の活性酸素産生機構について種々の検討を行っている。これまでに研究に用いてきたプランクトン株は1985年に鹿児島県で分離されたシャットネラ株をはじめとして, 人工的環境下で長期間培養維持されてきた株がほとんどで, 赤潮現場海域から分離された直後のプランクトンに対する解析が未だ行われていない。そこで, 本研究では今回, 小長井沖で発生した赤潮原因プランクトン, *H. akashiwo*の活性酸素産生能について, これまで長期間人工的環境下で培養してきたヘテロシグマ株と比較検討を行った。

材料および方法

(1) プランクトン株

ヘテロシグマ株をグロースキャビネット内で, Erd-

Schreiber modified (ESM) 培地, 26 °C, 3000 luxで12時間毎の明期, 暗期のサイクルで培養し, 対数増殖期の細胞を主に実験に用いた。ESM培地組成はTable 1に示した。各試薬EDTA-Fe³⁺, EDTA-Mn²⁺, vitamin B₁₂, biotinを脱イオン水に溶かしておき10 µlずつ海水1リットルに添加することにより設定濃度 (Table 1)になるようにした。その他の試薬は常温溶解し, 5 NのHClにてpH8.2に調整した後, オートクレーブ (121 °C, 20 min)を行ったものを培養及び実験に用いた。本実験には, 1979年に大阪湾で赤潮を形成した際に分離され維持された国立環境研究所株 (NIES-6) 及び2002年に当研究室が長崎県小長井沖で形成した赤潮から単離した2株を用いた。新たに小長井沖で分離された株についてはストレプトマイシンとペニシリンGをそれぞれ100 µg添加したESM培地にて数日培養したものについても, スーパーオキシドの測定及び培養系に存在する細菌の検出を行った。

(2) スーパーオキシドの測定

スーパーオキシドは, ウミホタル・ルシフェリン誘導体の化学発光試薬である2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA, (株)東京化成工業)を用いた化学発光法により測定した⁷⁾。測定には, 14-16 x 10⁴ cells/mlまたは3-15 x 10⁴ cells/mlのヘテロシグマ細胞浮遊液80 µl, MCLA10 µl (終濃度は5 µg/ml) 及びPhosphate buffer saline (PBS) を順次添加, 攪拌後, 1254ルミノメーター ((株)ライフサイエンスインターナショナルジャパン) で30秒間の発光パターンあるいは30秒間の積算値を測定した。この時の化学発光強度からPBSの代わりにスーパーオキシドの特異的消去酵素であるsuperoxide dismutase (SOD, (株)和光純薬工業)溶液10 µl (終濃度200 units/ml) を加えた時の化学発光強度を差し引いたものをスーパーオキシドによる化学発光とした。なお, キュベットはアイビス製の1.5mlマイクロチューブを用いた。MCLAは遮光しながら高純度蒸留水に溶かし, 5 mMの保存液を調整し -20 °Cで凍結保存したものを使用時に室温で遮光解凍してESMで100倍に希釈したものを使用した。また, SODは滅菌PBSに溶解後, -30 °Cにて凍結保存し, 使用時に室温解凍して使用した。

Table 1. Composition of Erd-Schreiber modified (ESM) culture medium

	(mg/l in natural seawater)
NaNO ₃	120
K ₂ HPO ₄	5
EDTA-Fe ³⁺	0.26
EDTA-Mn ²⁺	0.33
Vitamin B ₁	0.1
Vitamin B ₁₂	0.01
Biotin	0.001
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1000

The pH of medium was adjusted to pH 8.2 by addition of 5N HCl.

(3) 培養系内に存在する細菌の検出

小長井沖で分離された株について、抗生物質の添加の有無によるヘテロシグマ細胞浮遊液中の海洋細菌の生菌数を混積法により調べた。細菌の検出にはMARINE AGAR 2216培地 (Difco)を用いた。脱イオン水1リットルに対し、MARINE AGAR 2216培地55.1gを100 で完全に溶解後、オートクレーブ(121 , 15分)を行い45 に保温した。14-16 x 10⁴ cells/mlのヘテロシグマ細胞浮遊液、ヘテロシグマ細胞浮遊液を遠心分離器にて21000 x g, 3分間遠心分離して細胞を集め、再び元の濃度になるようにESMに懸濁したものを、培養上清及び超音波処理を行ったヘテロシグマ細胞浮遊液を10 µlずつシャーレに入れ、保温している培地を10-15ml 注ぎ良く振り混ぜた後固め、30 , 3日間インキュベーターにて培養した。

結 果

(1) 小長井沖で分離されたヘテロシグマ株の増殖曲線

2002年、当研究室にて分離したヘテロシグマ株の増殖を抗生物質添加及び無添加条件下で調べた。Fig. 1に示すように、抗生物質を添加した場合、無添加に比べ、その増殖が著しく良くなる現象が認められた。培養初期では両者に大差はなかったが、培養7日目以降から、抗生物質無添加培地での細胞密度は低下した。これに対して、抗生物質添加培養ではさらに増殖し続け、ピークに達した時の細胞密度は抗生物質無添加

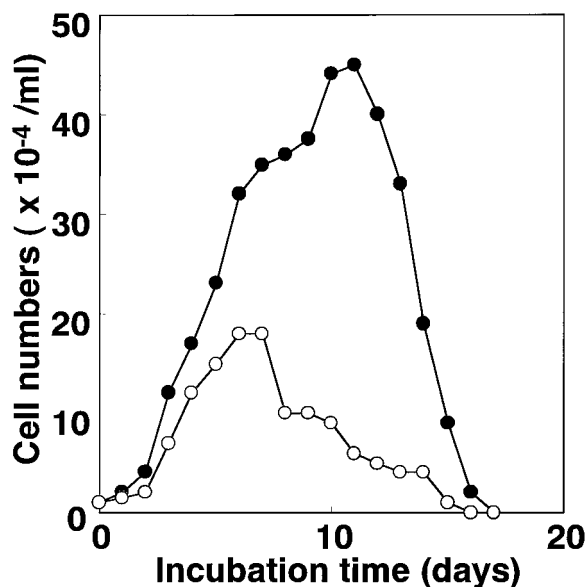


Fig. 1 The effect of antibiotics on the growth of *Heterosigma akashiwo* isolated from Isahaya Bay. Exponentially growing flagellate cells were inoculated into 50 ml of ESM medium in a final density of 1000-2000 cells/ml, and cultured at 26 in the presence (●) or absence (○) of 100 µg/ml of streptomycin and 100 µg/ml of penicillin under the conditions described in the text.

培養の2倍以上に達した。抗生物質無添加培養の場合、培養13日目以降に培地のわずかな白濁が認められ、細菌類の繁殖が疑われた。そこで、一般的海洋細菌用培地を用い、混積法により細菌の存在について検討した。その結果、Fig. 2に示すように、抗生物質無添加培養では、多数のコロニーの形成が確認されたのに対し、抗生物質添加培養ではコロニー形成は全く確認されず、少なくとも本実験で用いた寒天培地にて増殖可能な細菌はストレプトマイシンとペニシリンGにて死滅したと考えられる。さらに、Fig. 3に示すように、無傷な細胞浮遊液に比べ、超音波処理した細胞浮遊液では検出される細菌数の増加が認められた。また、プランクトン細胞を遠心分離により除去した上清中の細菌数はプランクトン細胞浮遊液の半分以下に低下であった (Fig. 3)。以上のことから、今回分離されたヘテロシグマ細胞浮遊液に検出された細菌の少なくとも半分以上はプランクトン細胞に付着あるいはプランクトン細胞に会合していると推定された。

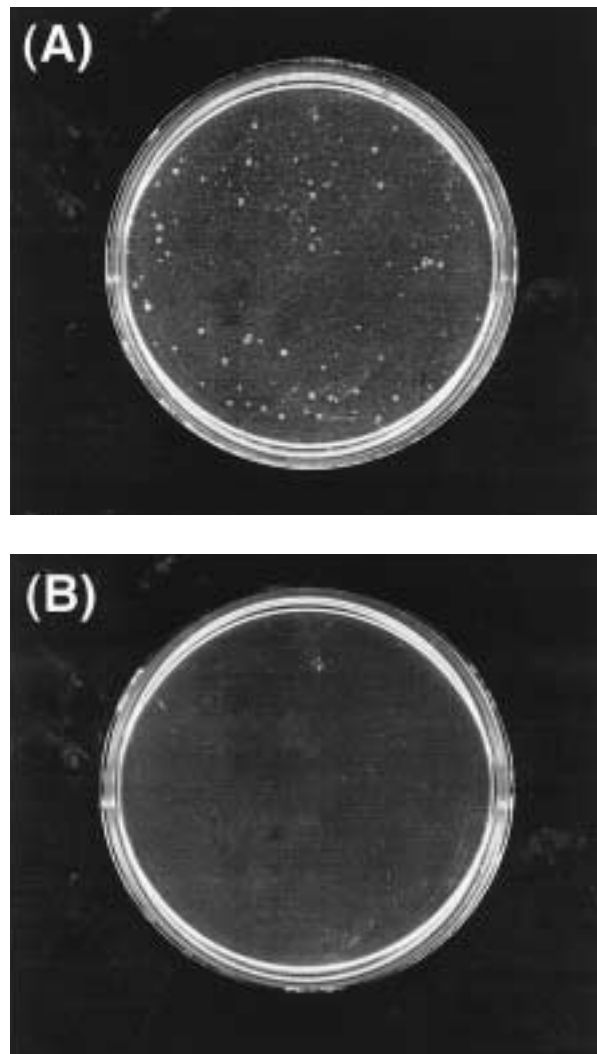


Fig. 2 Detection of bacteria in the 3-day culture of *Heterosigma akashiwo* isolated from Isahaya Bay in the presence (A) or absence (B) of 100 µg/ml of streptomycin and 100 µg/ml of penicillin.

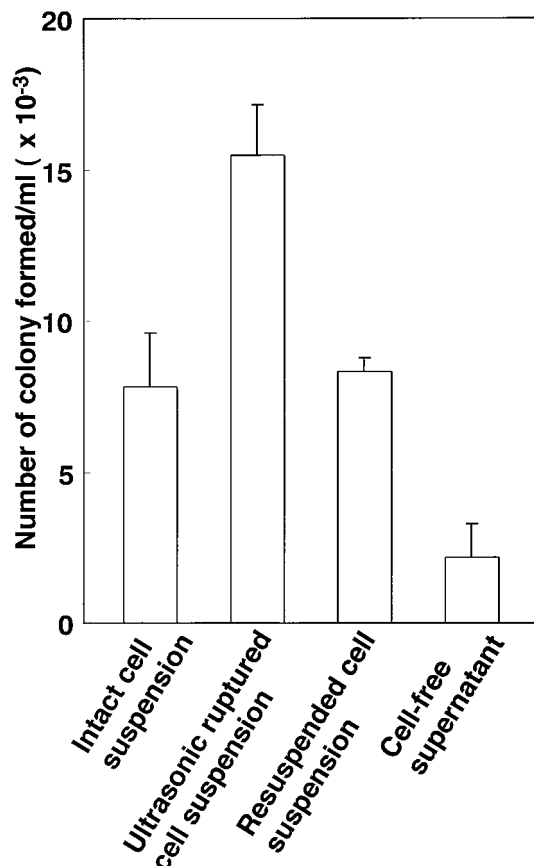


Fig. 3 Localization of associated bacteria in *Heterosigma akashiwo* isolated from Isahaya Bay. Numbers of the bacteria in intact cell suspension, ultrasonic ruptured cell suspension, resuspended cell suspension, and cell-free supernatant prepared from *H. akashiwo* were analyzed by colony formation assay using marine agar medium as described in the text.

(2) 抗生物質存在下非存在下にて培養したヘテロシグマの化学発光法によるスーパーオキシド産生能の比較

H. akashiwo (NIES-6) では, MCLAを添加すると同時に強い化学発光が認められ, その発光は経時的に暫減した。小長井沖由来株も*H. akashiwo* (NIES-6) とほぼ同様の発光パターンを示した (Fig. 4)。抗生物質を添加, 培養し, 細菌がほとんど検出されなくなったものと抗生物質無添加培養のものにおいても, その発光パターンに差異は認められなかった (Fig. 4)。

なお, 終濃度200 units/mlのSOD存在下では, これらヘテロシグマ株が誘導する発光はESM培地のみのバックグラウンドまで低下した。従って, ヘテロシグマによる発光はプランクトン細胞から産生放出されたスーパーオキシドによることが証明された。また, 一定期間に放出されるスーパーオキシドの総量を反映すると考えられる化学発光の積算値においても, 海洋細菌の有無や株の相違に関わらずほぼ一定の値が得られ, その値は細胞濃度依存的に上昇している (Fig. 5)。

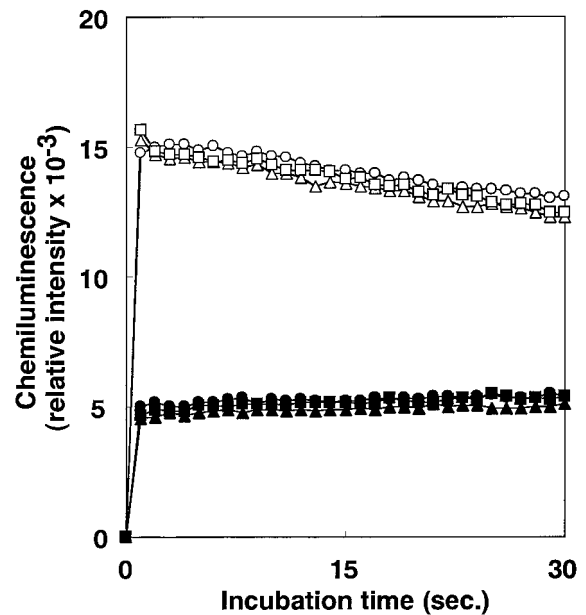


Fig. 4 MCLA-dependent chemiluminescence responses in *Heterosigma akashiwo* isolated from Isahaya Bay and NIES-6 strain. Newly isolated *H. akashiwo* from Isahaya Bay was cultured for 3 days in the presence (○, □) or absence (●, ■) of antibiotics (100 μg/ml of streptomycin and 100 μg/ml of penicillin), and then subjected to chemiluminescence assay as described in the text. (○, □); *H. akashiwo* (NIES-6 strain) from the National Institute for Environmental Studies, Environmental Agency. After addition of MCLA (final concentration at 5 μM), chemiluminescence response of each strain was measured in the presence (○, □) or absence (●, ■) of 200 units/ml of SOD.

考 察

赤潮プランクトンによる活性酸素産生に関する最初の報告としては1989年, Shimadaraが観察した, 通常の条件下で培養中の*Chattonella antiqua*にチトクロームC還元能が見い出されたとするものであろう⁸⁾。彼らは, この還元がSOD添加によって阻害されたことから, *C. antiqua*が活性酸素の一つであるスーパーオキシドを産生したと推定した。その後, 筆者らの研究室においても*C. marina*について同様に調べたところ, 細胞数に依存したチトクロームC還元が観察され, その還元はSOD添加により部分的に阻害されることが見い出された⁹⁾。チトクロームCはスーパーオキシド以外の還元性物質によっても容易に還元されることから, SOD添加により阻害された部分が真のスーパーオキシドによるものと考えられる。活性酸素産生能が知られている貪食細胞においては, スーパーオキシド産生時には通常, 過酸化水素も同時に検出される。そこで, スコプレチン法によって*C. marina*の過酸化水素産生について調べたところ, やはりシャットネラ細胞数に依存して過酸化水素が検出され, そ

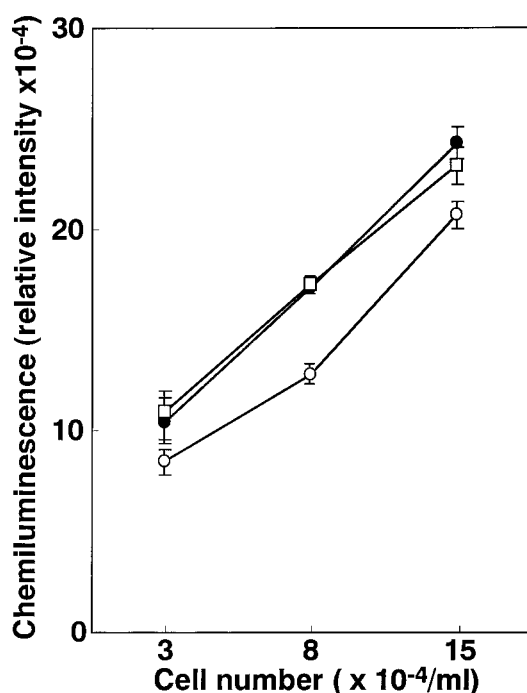


Fig. 5 Relationship between cell density and chemiluminescence response in *Heterosigma akashiwo* isolated from Isahaya Bay and NIES-6 strain. *H. akashiwo* newly isolated from Isahaya Bay was cultured for 3 days in the presence () or absence () of antibiotics (100 μ g/ml of streptomycin and 100 μ g/ml of penicillin), and then subjected to chemiluminescence assay at the indicated cell density. *H. akashiwo* (NIES-6 strain) () from the National Institute for Environmental Studies, Environmental Agency was also subjected to chemiluminescence assay.

の量は過酸化水素分解酵素であるカタラーゼ添加によってほぼ完全に検出限界以下に低下した⁹⁾。さらに、フェノールレッド法によっても正常な培養条件下で *C. marina* が過酸化水素を産生していることを観察している。一方、活性酸素の検出法としては電子スピン共鳴 (ESR) 法が最も信頼性が高いとされている。事実、スピントラップ剤である 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 存在下において *C. marina* 細胞浮遊液の ESR スペクトルを測定したところ、スーパーオキシド (DMPO-OOH) の他、より反応性にとみ毒性の強い活性酸素種であるヒドロキシラジカル (\cdot OH) の存在を示すシグナル (DMPO-OH) も見出された¹⁰⁾。これらのシグナルは SOD の添加によってほぼ完全に消失し、また、超音波処理により破壊した *C. marina* 細胞浮遊液では全く検出されなかった。さらに、ヒドロキシラジカルの検出法として最近報告された N-t-butyl-a-phenylnitron (PBN) を用いた方法によってもヒドロキシラジカルの存在が確認されている¹⁰⁾。その後の我々及び他の研究グループによってシャットネラと同様、ラフィド藻類に属するヘテロシグマについても活性酸素産性能が確認され、現在では、ラフィド藻類はすべて活性酸素を産生すると考えられている⁶⁾。ヘテロシグマ

やシャットネラは魚毒性が強い赤潮プランクトンとして知られており、これらのプランクトンの魚毒性発現時に、活性酸素が関与していると推測されるが、断定的結論には未だ至っていない。しかしながら、カナダの研究グループはヘテロシグマの魚毒性が活性酸素消去処理により低下したと報告している¹¹⁾。さらに、我々の研究においても、活性酸素産生能が低いシャットネラ株は高い株にくらべ魚毒性が著しく低いことが見い出されている¹²⁾。今後、ヘテロシグマやシャットネラの魚毒性発現と活性酸素産生との関連性については研究が必要であろう。

最近、ウミホタル由来のルシフェリン誘導体 (MCLA) を用いた高感度で簡便な化学発光法によるスーパーオキシド検出法が開発され¹³⁾、多くの研究者がプランクトンの活性酸素産生の検出に利用するようになった。この化学発光法を利用したこれまでの種々の解析から、ヘテロシグマとシャットネラの活性酸素産生機構には多くの類似点が見い出されている。すなわち、ある種のレクチンや鰓及び体表由来粘液物質添加により、両プランクトンともに、その活性酸素産生量が増加する点、膜不透過性蛋白質分解酵素 (proteinase K) 処理で、活性酸素産生が著しく阻害される点である¹⁴⁾。また、免疫学的手法により、両プランクトン表層には共通抗原が存在することも見い出されている¹⁵⁾。以上の点から、ヘテロシグマとシャットネラは細胞表層の糖皮膜であるグリコカリックスに活性酸素産生を司る酵素系を有しているとの推論に至っている。一方、ヘテロシグマは光合成能力を有するは植物プランクトンであることから、これまでに報告されている植物細胞内のミトコンドリア、ミクロゾームあるいはクロロプラストの電子伝達系と種々の酸化酵素による活性酸素産生系の関与の可能性が考えられる¹⁶⁾。最近、植物細胞の形質膜に活性酸素産生系が存在していることが示され¹⁷⁾、また、植物の生体防御においても活性酸素が重要な役割を演じているという報告もある¹⁸⁾。従って、細胞壁を持たず、物理的には非常に無防備なヘテロシグマ (おそらく、シャットネラを含む他のラフィド藻についても当てはまると思われる) は生体防御の一手段として強力な活性酸素産生機構を獲得することによって今日まで生き残ってきたと推論出来るかもしれない。

ヘテロシグマやシャットネラはどのような理由あるいは目的で活性酸素を産生しているのか、その生物学的意義についても多く点が不明である。今回、赤潮現場海域から分離された直後のヘテロシグマについて得られた知見は多くの示唆を与えるものである。これまで活性酸素産生の測定に用いられてきたプランクトン株は長期間、場合によっては10年以上人工的環境下で培養されてきた株であり、実際に海洋で赤潮を形成したプランクトンがどの程度の活性酸素を産生するか不明であった。Fig. 4 及び Fig. 5 に見られるように、スーパーオキシド産生に関しては、海洋から分離直後のヘテロシグマ株と国立環境研究所由来株の間にはほとんど差異は認められなかった。従って、少なくとも今回のヘテロシグマに関する結果から判断すると、長期間人工的環境での培養は活性酸素産生にはほとんど影響を与えなかったと言える。おそらく、ヘテロシグマにとって活性酸素産生は生命反応に必須な

代謝反応の一つと考えられる。このような推測は、これまでのシャットネラに関する我々の知見として、シャットネラの増殖が活性酸素消去酵素であるSODやカタラーゼ添加で著しく阻害されること、及び活性酸素産生が対数増殖期に最も高くなることを見出ししている点からも支持される¹⁹⁾。また、今回分離されたヘテロシグマには多数の細菌が付着していることを示唆する結果が得られた (Fig. 2 及び Fig. 3)。すなわち、無傷な細胞浮遊液全体を分析した際に検出される細菌数に比べ、超音波処理により破壊した細胞浮遊液では明らかに、形成される細菌コロニー数の増加が認められた (Fig. 3)。今回の実験結果からは詳細は不明であるが、何らかの細菌がヘテロシグマ細胞の表層あるいは内部に会合していたと推測される。抗生物質添加により、ヘテロシグマの増殖は無添加に比べ促進されたことから、どのような存在形態の細菌の影響かは不明であるが、これら共存細菌はヘテロシグマと競合的に働き、場合によってはプランクトンの増殖を抑制する可能性も考えられる (Fig. 1)。実際、ヘテロシグマの増殖を抑制するいわゆる殺藻細菌の存在が報告されている。興味あることに、抗生物質添加により共存細菌がほとんど検出されなくなったヘテロシグマの培養系と抗生物質無添加で多数の細菌が共存した状態のヘテロシグマ培養系におけるスーパーオキシド産生レベルにほとんど差異は認められなかった。好中球やマクロファージでは、感染によって侵入してきた細菌を殺す目的で活性酸素を産生することが知られているが、ヘテロシグマの場合、いわゆる細菌等に対する感染防御とは異なる目的で活性酸素を産生している可能性が考えられる。このことは、前述のSODとカタラーゼ添加で増殖が抑制されたとするシャットネラでの知見、抗生物質で共存細菌が著しく減少しても活性酸素産生量が変化しなかったことから支持される。興味あることに、シャットネラの場合、SODとカタラーゼ添加で増殖が著しく抑制された際、シャットネラ細胞が2ないし3個連結した状態が観察されている¹⁹⁾。従って、ヘテロシグマやシャットネラの場合、細胞分裂時に活性酸素が何らかの役割を果たしている可能性がある。生物界においては前述したように、活性酸素は主として貪食細胞が刺激を受けると産生し、殺菌作用など生体防御機構に関与すると考えられているが、それ以外にも種々の生体反応の過程で活性酸素が産生されることが明らかにされている。最近、このような貪食細胞以外での活性酸素産生が単なる生体反応の副産物ではなく、ある種のセカンドメッセンジャーとしての役割を担っているという考えが提示されている²⁰⁾。即ち、細胞周期進行の過程に過酸化水素が関与しており、G 1後期のDNA合成がカタラーゼによって上昇したことから、過酸化水素がG 1期からS期への進行に負に作用すると考えられている²¹⁾。さらに、蛋白性増殖因子である腫瘍増殖因子による遺伝子発現がカタラーゼ添加によって抑制されたことから、細胞外からの刺激が遺伝子発現として伝達される過程に過酸化水素が関与していると推定されている²²⁾。いずれにしろ、ヘテロシグマやシャットネラの活性酸素産生機構あるいはその意義の解明にはさらに研究が必要であろう。

謝 辞

小長井町沖の赤潮海水の採水に際し、小長井町漁業協同組合にご協力頂きました。ここに組合長 新宮 隆喜氏、並びに小長井町漁業協同組合の各位に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 松岡数充, 諫早湾における赤潮原因プランクトンの最近の変化, 長崎大学有明海シンポジウム『有明海的环境と資源』講演要旨集, (2002) 9-10.
- 2) 本城凡夫, 6・2ヘテロシグマ, 赤潮の科学 第二版, 岡市友利編 (1997) 255-264.
- 3) F. J. R. Taylor, Red tides, brown tides and other harmful algal blooms, the view into the 1990s. in Toxic Marine Phytoplankton (E. Graneri, B. Sundstrom, L. Elder and D. M. Anderson eds.). Elsevier Science Publisher B. V., (1990) 527-533.
- 4) H. F. Chang, C. Anerson and N. C. Boustead, First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of caged salmon in Big Clory Bay. *New Zealand. N. Z. J. mar. Freshwater Res.*, 24 (1990) 461-469.
- 5) 金 大景, 小田達也, 村松 毅, 赤潮原因プランクトン, *Chattonella marina*に存在する活性酸素消去物質に関する研究, 長崎大学水産学部研究報告書, 82 (2001) 93-97.
- 6) T. Oda, A. Nakamura, M. Shikayama, I. Kawano, A. Ishimatsu, T. Muramatsu, Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61 (1997) 1658-1662.
- 7) T. Y. Lee, N. Gotoh, E. Niki, K. Yokoyama, M. Tsuzuki, T. Takeuchi and I. Karube, Chemiluminescence Detection of Red Tide Phytoplankton *Chattonella marina*. *Anal. Chem.*, 67 (1995) 225-228.
- 8) M. Shimada, R. Shimono, T. Murakami, S. Yoshimatsu, C. Ono, Red tide, *Chattonella antiqua* reduces cytochrome c from horse heart. In: T. Okaichi, Anderson DM, T. Nemoto, Red tides: biology, environmental science and toxicology. Elsevier/ *New York*, (1989) 443-446.
- 9) T. Oda, A. Ishimatsu, M. Shimada, S. Takeshita, T. Muramatsu, Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.*, 112 (1992) 505-509.
- 10) T. Oda, T. Akaike, K. Sato, A. Ishimatsu, S. Takeshita, T. Muramatsu, H. Maeda, Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294 (1992) 38-43.
- 11) C. Z. Yang, L. J. Albright, A. N. Yousif, Oxygen-radical-mediated effects of the toxic phytoplankter

- Heterosigma carterae* on juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **23** (1995) 101-108.
- 12) Ishimatsu, T. Oda, M. Yoshida, M. Ozaki, Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Chattonella marina*. *Fisheries Sci.*, **62** (1996) 836-837
- 13) T-Y. Lee, N. Gotoh, E. Niki, K. Yokoyama, M. Tsuzuki, T. Takeuchi, I. Karube, Chemiluminescence detection of red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Anal. Chem.*, **67** (1995) 225-228.
- 14) T. Oda, A. Nakamura, T. Okamoto, A. Ishimatsu, T. Muramatsu, Lectin-induced enhancement of superoxide anion production by red tide phytoplankton. *Mar. Biol.*, **131** (1998) 383-390.
- 15) D. Kim, A. Nakamura, T. Okamoto, N. Komatsu, T. Oda, T. Iida, A. Ishimatsu, T. Muramatsu, Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1524** (2000) 220-227.
- 16) K. Asada, Ascorbate peroxidase -a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, **85** (1992) 235-244.
- 17) Vianello, M. Zancani & F. Macri, Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidoreduction linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, **1023** (1) (1990) 19-24.
- 18) N. Doke, Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts upon the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressor of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.*, **23** (1983) 359-367.
- 19) T. Oda, J. Moritomi, I. Kawano, S. Hamaguchi, A. Ishimatsu, T. Muramatsu, Catalase- and superoxide dismutase- induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59** (1995) 2044-2048.
- 20) M. Shibamura, T. Kuroki & K. Nose, Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene*, **5** (1990) 1025-1032.
- 21) M. Shibamura, T. Kuroki & K. Nose, Release of H₂O₂ and phosphorylation of 30 kilodalton proteins as early responses of cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by transforming growth factor beta 1. *Cell Growth Differ*, **2** (1991) 583-591.
- 22) M. Ohba, M. Shibamura, T. Kuroki and K. Nose, Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J. Cell Biol.*, **126** (1994) 1079-1088.