

まひ性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の無毒変異株

大村 卓朗*, 小野寺秀幸†, 石丸 隆**, 大島 泰克††

Non-toxic Mutational Strains in the Paralytic Shellfish Poisoning Causative Dinoflagellates, *Alexandrium* spp.

Takuo OMURA*, Hideyuki ONODERA†, Takashi ISHIMARU** and Yasukatsu OSHIMA††

Abstract : Non-toxic strains of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) have been established for the first time from a toxic clone of the species. For the analysis of biosynthesis of saxitoxin and its derivatives, toxic clonal cultures of dinoflagellates, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, were subjected to mutagenesis treatments, viz. heat shock and UV-C radiation. 41 clones of non-toxic *A. tamarense* were obtained. Furthermore, the original clone of *A. tamarense* proved its co-existence of non-toxic mutational cells during a five-year culture after its establishment. No difference was observed in the growth-irradiance relationship between a toxic and a non-toxic clone, suggesting the toxin production dose not affect their growth much. The analysis of guawdium related substances (arginine, agmatine and arcaine), which are considered to be precursors of the skeleton of saxitoxin indicated that the biosynthesis of saxitoxin in the non-toxic clones should be suspended at later phase of skeleton formation.

Keywords : まひ性貝毒 (PSTs), *Alexandrium*, 無毒突然変異株

1. はじめに

まひ性貝毒 (Paralytic Shellfish Toxins: PSTs) は水溶性の低分子化合物であり, 数種の海産渦鞭毛藻類によって生産される。PSTs産生渦鞭毛藻類は, 二枚貝に過捕食され, 貝に蓄積したPSTsは摂食した人間にしばしば致命的な中毒を引き起こす。このためPSTsは食品衛生上の大きな問題であり, また養殖貝の毒化による出荷規制から水産養殖上も大きな問題となっている。

PSTsを生産する海産渦鞭毛藻類には, *Alexandrium catenella*, *A. fundyense*, *A. minutum*, *A. tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*などが知られおり (Steidinger, 1993), この他に淡水産藍藻の *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis* (MAHMOOD and CARMICHAEL 1986, CARMICHAEL and FALCONER, 1993) や, *A. tamarense* の細胞内から単離された細菌が, PSTsを生産すること

が報告されている (KODAMA *et al.*, 1988, 1990)。このように, かけ離れた分類群の生物が毒を生産することから, PSTsの生産への内生細菌の関与 (KODAMA and OGATA 1988), 毒生産に関与するプラスミドの存在が考えられている (PLUMLEY 1997, SHIMIZU *et al.*, 1990)。

PSTsを生合成する渦鞭毛藻類は, いずれの種も複数のPSTsを生産する。PSTsにはsaxitoxin (STX)と骨格を共有する20を超える同族体の存在が明らかにされている (OSHIMA 1995a)。毒成分の種類とその組成は, 渦鞭毛藻自身の持つ変換酵素群の活性を反映すると考えられており, この酵素のうちN-sulfotransferaseやO-sulfotransferase等が検出されている (OSHIMA, 1995b, Yoshida *et al.*, 2002)。

一方Shimizuは, 淡水産ラン藻 *Ap. flos-aquae*を用いたアイソトープ取込み実験から, STXの骨格がアルギニンを出発点とし, 酢酸およびメチオニンの縮合によって形成されることを明らかにした (SHIMIZU, 1993)。さらに, 小野寺(2000)は, *An. circinalis*を用いてSTXの前駆体を検索し, グアニジノ化合物であるアルギニン→アグマチン→アルカインを経由する合成経路を推定した。しかしアルギニンからPSTs基本骨格にいたる過程は未解明である。

近年, 遺伝子工学的手法の急速な発達により, 特定の

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
〒113-8675 東京都文京区弥生1-1-1
Graduate School of Agricultural and Life Science
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8675 Japan

† 協和発酵工業(株)東京研究所

** 東京水産大学水産学部海洋環境学科

†† 東北大学大学院生命科学研究科

形質を発現する遺伝子を決定することが容易になって来た。このため、同一のPSTs産生種で有毒と無毒の株が得られれば、毒生産に関与する遺伝子や合成経路を解明することが可能である。

我々は、その第1歩として、PSTsを生産する*A. tamarense*, *A. catenella*, *A. minutum*から無毒株を得ることを目的とした。さらに得られた無毒株についてSTXの合成経路において生合成の停止した部位の推定を試みた。

2. 材料と方法

2-1 培養株と培養条件

本研究に用いた*Alexandrium tamarense* (OF935-AT6), *A. catenella* (OF950913, 無菌株) はそれぞれ1993年および1995年に大船渡湾から、*A. minutum* (CU Am-C5) は1990年にタイ王国チャントブリのエビ養殖池より採取・単離保存されたクローン株である。

継代培養は何れもT1培地(OGATA *et al.*, 1987a)よりNTAを除きEDTAを2倍量添加した培地で行い、*A. tamarense*ではさらに亜セレン酸20nMを添加した。*A. tamarense*では、塩分30, 温度15°C, 明期の光量85 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, *A. catenella*では塩分30, 温度20°C, 明期の光量85 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, *A. minutum*では塩分14, 温度25°C, 明期の光量100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で維持し、12hL:12hDの明暗周期を与えた。

2-2 突然変異誘導処理

物理的変異源を用いた突然変異誘導処理は、通常変異率の最も高くなる供試細胞の大部分を殺すような条件で行われる(JAGGER, 1967)。そのため細胞の生存する限界の条件をあらかじめ求め、その条件で処理した細胞からサブクローンを作る作業を繰り返した。

ヒートショック処理

新たな培地に摂取後約3週間を経過した前培養を試験管に分注し、水槽内(井内盛栄堂, デジタルサーマータMD-120)に置き、所定の時間を経過した後直ちに試験管を取り出し水道水で冷却した。処理条件は、*A. minutum*においては水温35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 55, 60°Cと処理時間2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20分を組み合わせた130条件、*A. tamarense*においては水温25, 28, 30, 32, 35, 38, 40, 42°Cと処理時間2, 4, 6, 8, 10分を組み合わせた40条件、*A. catenella*においては水温35, 38, 40, 42, 45°Cと処理時間2, 4, 6, 8, 10分を組み合わせた25条件である。処理後は、継代培養と同様の条件で培養を続け、細胞の生死を確認した。細胞は処理直後には動かないが2, 3日すると動き出すことや、あるいは処理直後には動いているが2, 3日で運動を停止して死滅することがある。このため生死の判定は、処理後1週間目に行った。同一条件での実験を3

回行い、生存限界の条件を決定した。条件決定後はその条件で処理を行い、1週間後に生存が確認された細胞を顕微鏡下でキャピラリーピペットを用いて吸い上げ、T1改変培地を1ml入れた24穴マイクロマルチプレートに1細胞ずつ接種した。接種後の培養は、継代培養と同様の条件で行い、ある程度細胞が増殖した時点で試験管に植え継いだ。処理株の細胞数が、1ml当たり約1000細胞以上になった時点で遠沈濃縮し、毒の分析に供した。

紫外線照射処理

時計皿に新たな培地に接種後約3週間を経過した*A. minutum*の培養を3ml入れ、細菌灯(15w2灯, 波長: 254nm, 光子: 4.9eV)の下において紫外線を照射した。放射照度は、紫外線強度計(東京光学機械, UVR-254形, 殺菌紫外線用)を用いて測定し、殺菌灯からの距離を調節することによって3段階(85, 105, 130 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$)に設定した。照射時間は8段階とし(1, 3, 5, 6, 10, 15, 20, 30分)これらを組み合わせた27条件で照射処理を行った。*A. tamarense*と*A. catenella*の照射処理は、殺菌灯(15W2灯, 波長: 254nm, 光子: 4.9eV)を取り付けた照射装置内に新たな培地に接種して3週間の培養を1ml入れたセジウィックラフターチェンバー(縦20mm, 横50mm, 容量1ml)を置いて行った。放射照度を865 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ に固定し、照射時間は1, 2, 2.5, 3, 4, 5分間の6条件とした。以下の操作はヒートショック処理の場合と同様である。

2-3 PSTsとグアニジノ化合物の分析

PSTsの分析には、1サンプル当たり1万細胞以上を供した。培養細胞をスウィングローター式遠心分離器により沈殿濃縮(3000回転, 約10分間)した後、さらに小型遠沈管(エッペンドルフ, 1.5ml)に移して遠心分離(約10分)を行い、沈殿に0.5N酢酸0.25mlを加えて凍結保存した。

PSTsの分析にはOSHIMA(1995c)のポストカラムー蛍光化HPLC法を用いた。カラムにはMightysil RP-8 GP, 4.6×150mm(関東化学)を、移動相としては、C1-C4については、1mMリン酸テトラブチルアンモニウム-3mMリン酸アンモニウム(pH6.0)を、GTX1-GTX6, dcGTX2, dcGTX3については2mMヘプタンスルホン酸ナトリウム-10mMリン酸アンモニウム(pH7.2)を、STX群には、2mMヘプタンスルホン酸ナトリウム-30mMリン酸アンモニウム(pH7.0)-4.4%アセトニトリルを用いた。流量は0.8ml/minとした。カラムからの溶出液に0.4ml/minの流量で7.0mM過ヨウ素酸溶液-50mMリン酸カリウム緩衝液(pH5.8)を連続的に添加し蛍光誘導化を行い、0.5M酢酸を0.4ml/minの流量で加えて感度を上昇させ、蛍光モニターで検出した(励起波長330nm, 検出波長390nm)。

グアニジノ化合物に関しては、BAKER *et al.*(1981)の

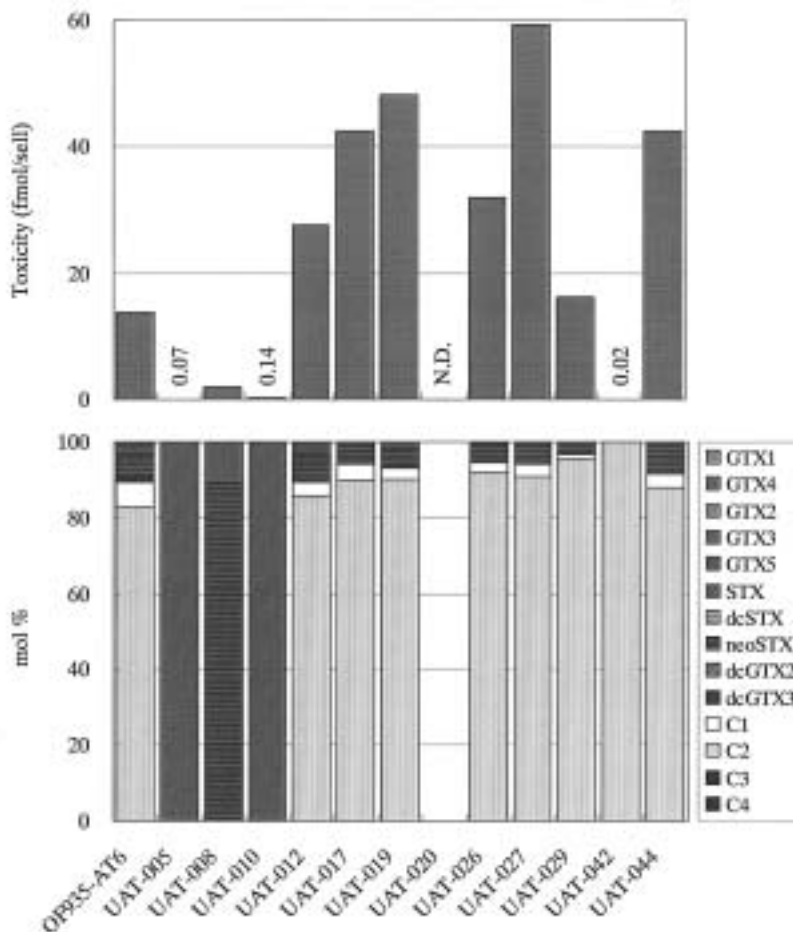


Fig. 1. Toxicity (top) and toxin composition (bottom) of *A. tamarense* (OF935-AT6) and its UV treated toxic sub-clones soon after the establishment. UAT-020 was non-toxic in this analysis, but toxic after four months (Fig.2).

ポストカラム蛍光化HPLC法を一部改変した方法(小野寺, 2000)を用いた。カラムにはCosmosil 5 C18AR II, 4.6×250mm (ナカライテスク), 移動相には 2 mMヘプタンスルホン酸ナトリウム-50mMギ酸-23%メタノール(pH4.5)を用い, 流量は0.8ml/minとした。カラムからの溶出液に0.2ml/minの流量で 2 M水酸化カリウムを加えてアルカリ性にし, 次に0.4ml/minの流量で2.5 mM 9, 10-フェナントレンキノン(ジメルチルフォルムアミドに溶解)を添加して反応させて蛍光誘導化し, 蛍光モニター(島津RF-10A_{XL}, 励起波長373nm, 検出波長465nm)によって検出した。

2-4 成長に及ぼす光の影響

上記の処理で得られた *A. tamarense* の無毒サブクローンUAT-014をピペット洗浄法により無菌化したUAT-

014-009株とOF935-AT 6株からピペット洗浄により無菌化した有毒サブクローンAxat-2を用いて, 光-成長速度の関係を求めた。

培地には, 改変T 1培地を用い, 温度15°C, 塩分30の下で光量30, 50, 75, 100, 125 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の12条件で行った。照明には高照度蛍光灯(Twin-2 parallel 100W, National)を用いた。成長の測定には, 蛍光光度計(Turner Designs, Model 10)により *in vivo*クロロフィル蛍光値を1日おきに測定し増殖曲線を作成し, 増殖速度 $\mu_2(\text{d}^{-1})$ を求めた。

$$\mu_2 = t^{-1} \log_2(F_2/F_1)$$

ここで, F_1 , F_2 はいずれも対数増殖期の初めと終わり近くの *in vivo*クロロフィル蛍光値, t は2回の測定間の日数である。

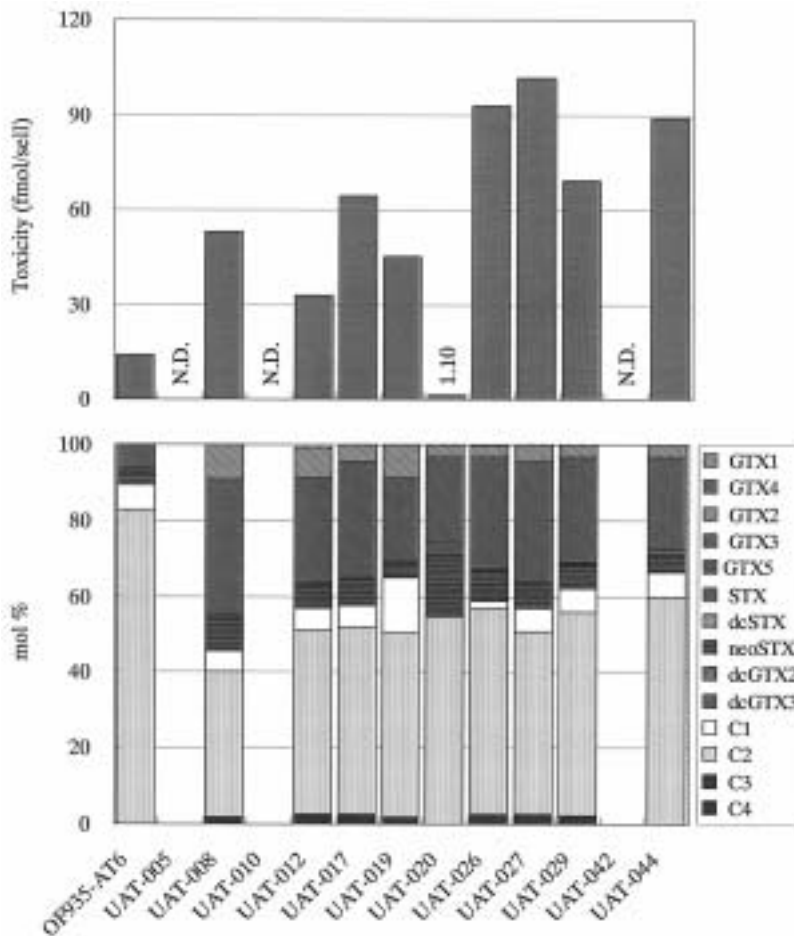


Fig. 2. Toxicity (top) and toxin composition (bottom) of *A. tamarense* (OF935-AT6) and its UV treated toxic sub-clones reanalyzed after four months of the first analysis (Fig. 1). About five times more cells were used for the analysis. UAT-005, 010 and 042 were non-toxic in this analysis.

3. 結果

3-1 ヒートショック処理株における細胞当たり毒量と毒組成変化

*Alexandrium minutum*では、ヒートショック処理による生存限界は、20分の処理時間では38°Cであり、39°Cで死滅した。以下40°C-8分、42°C-4分、45°C-2分が生存限界であった。サブクローンの作成は、42°C-4分と40°C-6分の条件で試み、後者で21株を得た。これら21株の細胞当たり毒量は、もとの株に比べて約4倍から約1/4の範囲にあり、無毒株を得ることは出来なかった。毒組成については、何れもGTX4が最も多く、次いでGTX1であり、処理前と比較して毒組成が大きく変化した株は得られなかった。

*A. catenella*の生存限界は、38°C-6分、40°C-4分、42°C-2分であり、サブクローンの取得は38°C-6分で試み92株を単離した。これらの細胞当たり毒量は処理前

と比較して、約5倍から約1/2であり、無毒株を得ることは出来なかった。毒組成については、何れもC2が最も多く、次いでneoSTXとC1であり、毒組成が大きく変化した株は得られなかった。

*A. tamarense*の生存限界は、35°C-8分、38°C-6分、40°C-2分であり、サブクローンの作成は、35°C-8分で試みたが、単離後における細胞の増殖は、2細胞から数10細胞で停止し、株を作成することは出来なかった。

3-2 紫外線照射処理株における細胞当たり毒量と毒組成変化

*A. minutum*では、紫外線照射処理による生存限界を決める予備実験においては、照度85 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ では6分で生存細胞が認められ、10分では死滅した。105および135 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ では何れも5分で生存、6分で死滅した。処理株の作成は、これら3つの放射照度、処理時間5分で行

い、生存した細胞から49株を単離した。これら49株の細胞当たり毒量は処理前に比べ、約5倍から約1/4の範囲であり、無毒株は得られず、毒組成についてはいずれもGTX 4が最も多く、次いでGTX 1であり、大きな変化は認められなかった。

*A. catenella*と*A. tamarense*では、ともに6回の照射実験を行い、*A. catenella*では、5回中4回では2.5分で生存細胞が認められ3分では死滅した。また1回は3分で生存、4分で死滅した。*A. tamarense*では、6回とも2分で生存細胞が認められ、2.5分で死滅した。以上から*A. catenella*では2.5分照射、*A. tamarense*では、2分間照射処理した細胞についてサブクローンの作成を試みた。

*A. catenella*では、紫外線照射処理株88を得たが、細胞当たり毒量は処理前に比べて約4倍から約1/4の範囲にあり、無毒株は得られなかった。また、毒組成は、すべての処理株でC 2が最も多く、次いでneoSTXとC 1が多く、処理を行わなかった株と差はなかった。

*A. tamarense*では、紫外線照射処理により、サブクローン50株を単離した。これらのうち39株では毒が検出されなかった(検出限界0.05 fmol/cell)。また、有毒株11株では、細胞当たり毒量と毒組成が処理前に比較して大きく変化した(Fig. 1)。処理前と比較し、細胞当たり毒量は最大でUAT-027の約4倍、最小でUAT-042の約1/70であった。毒組成は、UAT-005, 008, 010を除く8株では、C 2が大部分を占め、次いでneoSTXが多かった。UAT-005, 010の毒組成はGTX 3だけで構成され、UAT-008の毒組成はGTX 2が大部分を占め、次いでGTX 3が多かった。

無毒変異株の無毒性の時間的安定性を確認するために約4ヵ月後に1回目の約5倍の細胞数を用いて毒成分を精査した。この結果では、50株のうち41株が無毒であった。1回目の分析で極めて低い毒性を有することが観察されたUAT-005, 010, 042の3株からは毒性は検出されず、一方、1回目の分析では毒が検出限界以下であったUAT-020からは微量の毒が検出された。有毒であった9株では、処理前に比べて細胞当たり毒量は、最大でUAT-027の約4倍、最小でUAT-020の1/13であった(Fig. 2)。毒組成は、C 2が約半分の割合を占め、GTX 4とneoSTXが次いだ。

3-3 突然変異の検証

*A. tamarense*の無毒サブクローンの得られた割合は、突然変異によるものにしては高すぎるため、元の株に無毒細胞が混在していなかったかどうかを確認した。*A. tamarense* OF935-AT 6株よりピペットによる選別から新たに51株のクローン株を作成し、PSTsを分析した。この分析の結果、無毒サブクローンは22株存在し、処理前の培養株には、すでに無毒の細胞が存在していたことが判明した。

3-4 無毒および有毒サブクローンにおけるまひ性貝毒関連物質の探索

OF935-AT 6より単離した無毒および有毒サブクローンについて、PSTsの前駆物質と考えられるグアニジノ化合物を分析した。その結果の1例をFig. 3に示す。有毒および無毒サブクローン各2株からは、アルギニン、アグマチン、アルカインの標品とそれぞれ保持時間が等しい3成分の他に未知成分のピークがいくつか検出された。

3-5 成長生理学的特性の比較

有毒無菌サブクローンAxat-2と無毒無菌サブクローンUAT-014-009について得られた光-成長曲線をFig. 4に示す。何れの株も最も低い光量の $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から成長し、 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で光飽和に達した。最大生長速度は、それぞれ約0.41, 0.42d^{-1} であった。有毒株と無毒株の間において、成長に差は認められなかった。

4. 考察

本研究から多数の*A. tamarense*の無毒株が得られた。これは、*A. tamarense*の有毒クローン内において突然変異により生じた無毒サブクローンを得た初めての報告である。これらの無毒変異株は、物理的変異源による人為的突然変異ばかりではなく長期間(約5年)にわたる維持・継代培養の間に発生した自然発生型突然変異によって形成されたと考えられる。有毒株と無毒株の成長速度-光強度の関係に差が無いことから、毒の生産は、少なくとも培養条件下では成長に影響を及ぼさないものと考えられる。無毒株のうちUAT-014-009株は単離後3年経過した後に毒性を精査したが結果は無毒のままあることが確認され(大村未発表)、この形質は、無毒株において安定したものであると考えられる。

紫外線照射処理後に単離したサブクローン中の無毒株の比率は処理せずに単離したサブクローン中のその約2倍であり、無毒細胞のほうに紫外線に対する耐性が強い可能性がある。一方、紫外線照射処理サブクローンのうち有毒であった株の細胞あたり毒量と毒組成の1回目と2回目の分析結果(Fig. 1, 2)を比較すると、多くのサブクローンにおいて細胞あたり毒量が増加し、また組成にも変化が見られた。これらのうち、極めて毒量の小さいUAT-005, 008, 010, 042(Fig. 1)、UAT-020(Fig. 2)が、それぞれの分析において他の株と異なる毒組成を示した事は、検出感度による誤差である可能性が高い。それ以外の株において、1回目ではGTX1, 4が見られず、2回目では30-40%の割合で見られたことは、紫外線照射が毒生産に何らかの影響を及ぼした結果であると考えられる。また、1回目と2回目の分析結果において無毒変異株の割合が異なった理由として、検出感度による誤差が考えられるが、1回目と2回目の分析間隔は約4ヶ月ありバックミュージーテーションの可能性も否定できない。

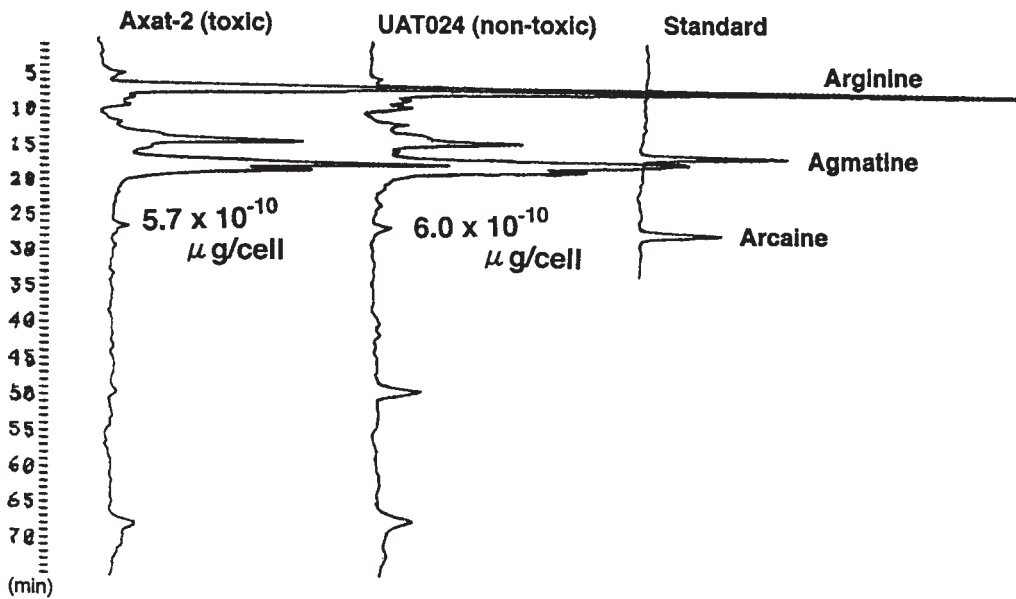


Fig. 3. Appearance of guanidium related substances in toxic (left) and non-toxic (center) subclones of *A. tamarense*.

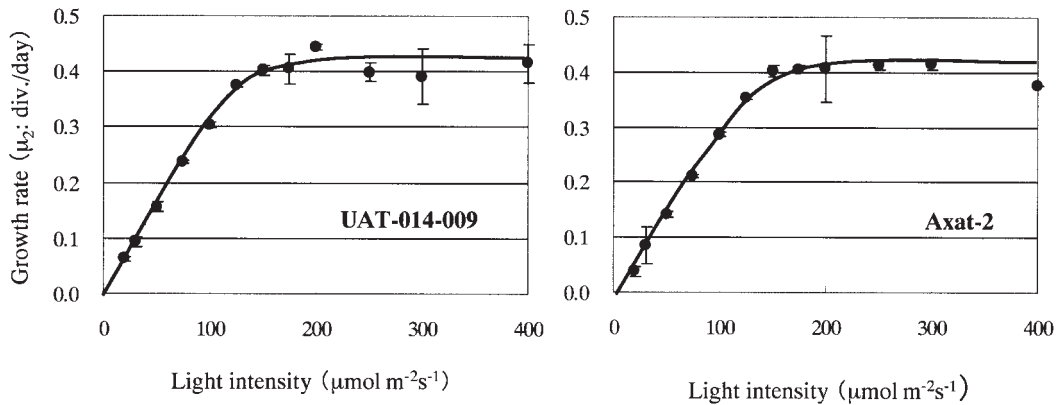


Fig. 4. Growth-irradiance relationships for non-toxic (UAT-014-009, left) and toxic (Axat-2, right) sub-clone of *A. tamarense*.

*A. tamarense*のサブクローンに関して行ったグアニジノ化合物の分析では、有毒株、無毒株のいずれにおいてもアルギニン、アグマチン、アルカインの全てが検出された。無毒株のまひ性貝毒生成経路が、ある部分で欠落していると考えれば、その部分で前駆物質が多量に蓄積すると考えられる。しかし無毒株のグアニジノ化合物の分析結果において、特定の前駆物質の多量な蓄積は認められなかった。これらのことから、無毒株における毒の生合成は、本研究で調べたグアニジノ化合物よりもさらに進み、PSTsの基本骨格の構造に近い状態まで進ん

でいると考えられる。

本研究において得られた有毒株と無毒株は、同一の親株より得られたサブクローンであるため、PSTsの生合成に関与する遺伝子以外は相同である可能性が高い。これらの株を用いて遺伝子に関する研究を分子生物学的手法を用いて進めることによってPSTs生合成に関与する遺伝子、酵素について明らかに出来ると考えられる。

*A. tamarense*の模式標本の産地であるイギリスのタマール川河口から単離された株は無毒である(MOESTRUP and HANSEN, 1988)。しかし、この種は、現

在の *Alexandrium* 属の分類形質に基づけば *Alexandrium acatenella* に近いものと考えられる (福代私信)。我が国では、緒方ら (OGATA *et al.*, 1987b) は大船渡湾において *A. tamarense* の多数の培養株を作成し、株による毒生産能の差が大きいことを報告しているが、無毒株は得ていない。また株の分離は他の多くの研究者によっても行われているが、無毒株が得られたとの報告はない。従って、*A. tamarense* においては、天然条件下で無毒細胞が存在するかどうかは明らかでないが、存在するとしてもその頻度は極めて低いものと考えられる。この理由として、有毒株が動物プランクトンに捕食されず、一方、無毒株は捕食を受けるため増殖に差が生じることが考えられる。TEEGARADEN (1999) は、カイアシ類 3 種 (*Acartia tonsa*, *Centropages hamatus*, *Eurytemora herdmanii*) が、PSTs をもつ *Alexandrium* 属を捕食しないことを報告している。一方、FRANGOPULOS *et al.* (2000) は、*Acartia clausi* が、*A. minutum* を忌避する兆候は見られないが、卵の発生やその後のノープリウスの成長に影響を与えると報告しており、PSTs の生態学的意義は明確ではないものの、多量の毒を合成するエネルギー的なコストを考えれば、恐らくは有毒細胞は忌避され、無毒細胞に選択的な捕食圧がかかることが考えられる (TEEGARADEN, 1999)。毒の合成には、新たなアミノ酸合成が必要である (OGATA *et al.*, 1987a) が、本研究では、有毒株と無毒株の光-成長関係には差は認められず、少なくとも窒素栄養が十分存在する条件下では、光エネルギーを毒生産により多く振り向ける必要性があることは示されなかった。PSTs の合成には窒素栄養を必要とすることから、有毒株においては毒合成に栄養塩を配分する必要があり、それに見合った利益が PSTs 生産にはあるものと考えられる。今回得られた無毒サブクローンと有毒サブクローンをを用いた研究により、渦鞭毛藻における PSTs の生産が進化生態学的にどのような役割を持つのか明らかに出来ることが期待される。

5. 謝辞

本研究に用いた *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. minutum* の培養株を分与頂いた、北里大学水産学部 緒方武比古教授、小池一彦講師に感謝する。

引用文献

- BAKER, M.D., H.Y. MOHAMMED and H. VEENING (1981): Reversed-phase ion-pairing liquid chromatographic separation and fluorometric detection of guanidino compounds. *Anal. Chem.*, **53**, 1658-1662.
- CARMICHAEL, W.W. and I.R. FALCONER (1993): Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. 1187-1209. *In* *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, FALCONER, I.R. (ed.), Academic Press.
- FRANGOPULOS, M., C. GUISANDE, I. MANERIO, I. RIVERIRO, and J. FRANCO (2000): Short-term and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **203**, 161-169.
- JAGGER, J. (1967): *Ultraviolet Photobiology*. Prentice-Hall, Inc., 181pp.
- KODAMA, M. and T. OGATA (1988): New insights into shellfish toxins. *Mar. Pollut. Bull.*, **19**, 559-564.
- KODAMA, M., T. OGATA, and S. SATO (1988): Bacterial production of saxitoxin. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1075-1077.
- KODAMA, M., T. OGATA, S. SAKAMOTO, T. HONDA and T. MIWATANI (1990): Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. Isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon.*, **28**, 707-714.
- MOESTRUP, O. and P. J. HANSEN (1988): On the occurrence of the potentially toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* (= *Gonyaulax excavata*) and *A. ostenfeldii* in Danish and Faroese Waters. *Ophelia*, **28**, 195-213.
- MAHMOOD, N.A. and W.W. CARMICHAEL (1986): Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon*, **24**, 175-186.
- OGATA, T., T. ISHIMARU and M. KODAMA (1987a): Effects of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Marine Biol.*, **95**, 217-220.
- OGATA, T., M. KODAMA and T. ISHIMARU (1987b): Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon.*, **25**, 923-928.
- 小野寺秀幸 (2000): ラン藻の生産する神経毒に関する化学的研究. 東北大学博士論文. 217pp.
- OSHIMA, Y. (1995a): Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. 81-94. *In* *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraef, G. M., D.M. ANDERSON, and A.D. CEMBELLA (eds.), IOC Manuals and Guides No.33. UNESCO.
- OSHIMA, Y. (1995b): Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxin in marine organisms. 475-480. *In* *Harmful Marine Algal Blooms*. LASSUS, P. *et al.* (eds.), Lavosier, Intercept Ltd.

- OSHIMA, Y. (1995c): Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Internat.* **78**, 528-532.
- PLUMLEY, F.G. (1997): Marine algal toxins : Biochemistry, genetics, and molecular biology. *Limnol. Oceanogr.*, **42**, 1252-1264.
- SHIMIZU, Y.(1993): Microalgal metabolites. *Chem. Rev.*, **93**, 1685-1698.
- SHIMIZU, Y., S. GUPTA and A.V.K. PRASAD(1990): Biosynthesis of dinoflagellate toxins. 62-73. *In Toxic Marine Phytoplankton.* GRANALI, E. *et al.* (eds.) Elsevier.
- STEIDINGER, K.A.(1993): Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. 1-28. *In Algal Toxins in Seafood and Drinking Water.* FALCONER, I.R. (ed.), Academic press.
- TEEGARADEN G.J.(1999): Copepod grazing selection and particle discrimination on the basis of PSP toxin content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **181**, 163-176.
- Yoshida T., Y. Sako, A. Uchida, T. Kakutani, O. Arakawa, T. Noguchi and Y. Ishida (2002) : Purification and characterization of sulfotransferase specific to O-22 of 11-hydroxy saxitoxin from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (dinophyceae). *Fisheries Sci.*, **68**, 634-642.

受付：平成14年 8 月26日

受理：平成15年 6 月10日