HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アマモ場に生息する細菌による麻痺性貝毒渦鞭毛藻 Alexandrium tamarense の防除に関する生理生態学的研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	大西, 由花
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11321号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55356
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Onishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：大　西　由　花

学 位 論 文 題 目

アマモ場に生息する細菌による

麻痺性貝毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の防除に関する生理生態学的研究

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* は強力な神経毒を生産し，二枚貝に摂餌され麻痺性貝毒による毒化を生じる。貝毒は発生水域の拡大および発生件数の増大が世界規模で認められているため，予防策の策定は喫緊の課題である。近年，赤潮藻類を殺滅する微生物による生物学的防除法が有望視されており，殺藻細菌がアマモ表面のバイオフィルム中に高密度で存在することが明らかになった。本研究は北海道函館市臼尻のアマモ場，北海道東部厚岸湖および厚岸湾，米国ワシントン州ピュージェット湾のアマモ場において *A. tamarense* に対する増殖阻害細菌を探索し，細菌の生態に着目して増殖阻害活性を検討することを目的とした。

1，北海道函館市臼尻のアマモ場での *A. tamarense* 増殖阻害細菌の探索
試料の採集は，2009 年 10 月 15 日，北海道函館市臼尻町にある臼尻漁港付近で実施した。アマモ葉体を採集し，滅菌濾過海水を用いて葉体表面のバイオフィルムと共に細菌を剥離した。その海水を段階希釈して *A. tamarense* を対象藻類としたマイクロプレート MPN 法による殺藻試験に供した。増殖阻害が認められた区画から得られた細菌 23 株を PCR 法による 16S rRNA 遺伝子解析を行った。そして，増殖阻害能の強い細菌株を選抜するためにスクリーニングを行い，E8 株および E9 株の増殖阻害細菌を得た (相同性 100％)。それらは Cytophaga/*Flavobacteria/Bacteroides* のグループ (CFB グループ) に属する細菌で，それらとほとんど同じ塩基配列を持つが増殖阻害能を持たない細菌 E4-2 株 (E8 株および E9 株との相同性 100％) および E10 株 (99.80%) も単離された。
接種密度の影響を検討するために，増殖阻害細菌 E9 株を初期添加密度 10^0–10^7 cells mL^{-1} までの 8 段階になるよう *A. tamarense* 培養に添加した。その結果，全実験区で藻類の著しい減少を確認した。次に，*A. tamarense* 培養に E9 株を添加して増殖を阻害させた後に，濾過により細菌と藻類細胞を完全に除去し，その濾液が 50% および 80%の濃度になるよう *A. tamarense* 培養に添加した。その結果，全ての濾液添加区で増殖阻害が観察されたことから，増殖阻害物質生産型の細菌であることが分かった。また，他種の微細藻類に細菌 E9 株を添加した結果，渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*，ラフィド藻 *Chattonella antiqua* および *Heterosigma akashiwo*，珪藻 *Chaetoceros mitra* に増殖阻害能を発揮した。

2，北海道東部厚岸湖および厚岸湾での *A. tamarense* 増殖阻害細菌の探索
試料の採集は 2011 年 4 月 21 日から 6 月 29 日，北海道厚岸郡厚岸町の厚岸湖および厚岸湾にて，週に一回実施した。採集地点は，厚岸湖のアマモ場，厚岸湾北部および南部に 1 地点

ずつ設け，厚岸湖ではアマモ葉体と表面海水を採集し，他の 2 定点では層別採水をした。各定点の海水試料は滅菌濾過海水で希釈し，ヌクレポアフィルターで吸引濾過した。フィルター上の細菌を粒子付着性細菌 (Particle-Associated Bacteria: PAB)，濾液中の細菌を浮遊性細菌 (Free-Living Bacteria: FLB) と区分し，$ST10^{-1}$ 寒天培地で平板培養した。アマモ葉体試料は，臼尻での採集と同様の手法で処理し，滅菌濾過海水で希釈して $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗抹した。これらの平板培養は，培養の後にコロニーを単離して，*A. tamarense* との二者培養試験に供した。増殖阻害細菌はアマモ葉体表面から全 11 回の調査中 7 回単離され，その密度は約 10^6 CFU g^{-1} wet leaf であった。アマモ場海水中からは約 10^3 CFU mL^{-1}，厚岸湾からも約 10^2 CFU mL^{-1} の密度で検出された。

3, ピュージェット湾のアマモ場での *A. tamarense* 増殖阻害細菌の探索

試料の採集は 2012 年 6 月 9 日から 7 月 5 日，米国ワシントン州ピュージェット湾内のアマモ場 13 定点，ケルプ場 1 定点，沿岸の海草も海藻もない 1 定点および沖合の 3 定点で実施した。海水試料と葉体試料は上記と同様に処理し，アマモ葉体表面および海水 (PAB および FLB) から細菌を単離して *A. tamaresne* との二者培養試験に供した。その結果，増殖阻害細菌は North Bay および Dumas Bay のアマモ葉体試料から，Holmes Harbor (FLB), North Padilla Bay (PAB), Potlatch (PAB) の海水試料から検出された。

4, PCR 法による増殖阻害細菌の 16S rRNA 遺伝子解析

厚岸湖および厚岸湾から 54 株，ピュージェット湾から 7 株の *A. tamarense* 増殖阻害細菌を単離した。これらの遺伝子解析を PCR 法に基づいて行った。

本研究で得られた増殖阻害細菌 61 株は *Alphaproteobacteria* (12 株), *Betaproteobacteria* (1 株), *Gammaproteobacteria* (19 株), CFB グループ (23 株), *Bacteroides* (3 株), *Actinobacteria* (4 株) および *Bacilli* (2 株) に分けられた。

5, 単離細菌のクオラムセンシング機構の検討

細菌 61 株を $ST10^{-1}$ 液体培地で培養し，初期接種密度が 10^4 cells mL^{-1} になるよう調整して *A. tamarense* 培養に添加したが，当初の二者培養試験で確認された増殖阻害能を確認できなかった。次に細菌 61 株のコロニーを用いて細菌懸濁液を調製し，初期接種密度が 10^4 cells mL^{-1} になるよう藻類培養に添加したが，やはり効果がみられなかった。そこで，コロニーをそのまま藻類培養に添加したところ，19 株の細菌添加区で増殖阻害が再現された。そこでこれらの細菌を対象にクオラムセンシング機構の有無を検証した。

A. tamarense 培養を試験管に用意し，アシルホモセリンラクトン類を介したクオラムセンシングの阻害剤 β-シクロデキストリンを，終濃度 1, 10, 100 μM になるよう添加し，各細菌株をコロニーのまま藻類培養に添加して，蛍光値の測定により *A. tamarense* の増殖をモニターした。その結果，3 株で β-シクロデキストリンによるクオラムセンシングの阻害が確認できたことから，これら 3 株はホモセリンラクトン類を介したクオラムセンシングを通じて *A. tamarense* の増殖を阻害している可能性が示唆された。

本研究により，アマモ場には *A. tamarense* の増殖を阻害する細菌が生息していることが明らかにされた。今後は，沿岸域を保全しアマモ場の涵養を通じて，健全で安定的な二枚貝類の生産を支える方策を探る必要がある。