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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：大　西　由　花

審査委員

主査　教授　久　万　健　志
副査　教授　今　井　一　郎
副査　教授　澤　辺　智　雄
副査　教授　仲　岡　雅　裕

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，二枚貝に摂餌され麻痺性貝毒による毒化を生じる。貝毒の発生は世界規模で増大しており，喫緊に予防策が必要である。近年，赤潮対策として殺藻細菌が注目され，アマモ場に多数の生息が見出された。本研究は，アマモ場における *A. tamarense* 増殖阻害細菌の分布と生態の解明を目指し，北海道函館市臼尻のアマモ場，同厚岸湖と厚岸湾，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* に有効な増殖阻害細菌を探索し，増殖阻害活性を検討した。得られた成果は以下の様に要約される。

1. 北海道函館市臼尻のアマモ場での *A. tamarense* 増殖阻害細菌

臼尻漁港付近で 2009 年 10 月 15 日に試料を採取した。得られたアマモ葉体から細菌を含むバイオフィルムを得て，*A. tamarense* を対象に試験を行い，増殖阻害が認められた試験区から細菌 23 株を得た。これらについて 16S rRNA 遺伝子解析を行い，増殖阻害能の強い細菌株をスクリーニングし，*Cytophaga*/*Flavobacteria*/*Bacteroides* グループ (CFB グループ) に属する E8 株と E9 株の 2 株の増殖阻害細菌を得た (相同性 100%)。同時に，ほぼ同じ塩基配列だが増殖阻害能を示さない細菌も 2 株単離された。

増殖阻害細菌 E9 株は，1 細胞でも *A. tamarense* 培養に添加した場合，藻細胞を著しく減少させた。これらは増殖阻害物質生産型の細菌であった。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. 厚岸湖および厚岸湾での *A. tamarense* 増殖阻害細菌

厚岸湖アマモ場および厚岸湾 2 点にて，2011 年 4 月 21 日から 6 月 29 日，毎週 1 回調査を実施した。厚岸湖ではアマモ葉体と表層海水，他では層別採水を行った。海水試料は孔径 3μm フィルター上の細菌を粒子付着性細菌，通過する細菌を浮遊性細菌として寒天培地で培養した。得られた細菌は *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 (colony forming units) g^{-1} 湿重であった。アマモ場海水中で約 10^3 CFU mL^{-1}，厚岸湾から約 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

ピュージェット湾内のアマモ場 13 点，ケルプ場 1 点，沿岸水域 1 点，沖合 3 点で，2012 年 6 月 9 日から 7 月 5 日に試料を採取した。得られた細菌の *A. tamaresne* の増殖阻害能を検討した。その結果，増殖阻害細菌は North Bay と Dumas Bay のアマモ葉体，及び 3 点のアマモ場の海水から検出された。

4, PCR 法による増殖阻害細菌の 16S rRNA 遺伝子解析

厚岸湖と厚岸湾から 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行った結果, *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，10^4 cells mL^{-1} で *A. tamarense* に接種したが，増殖は阻害されず，次に細菌コロニーの懸濁液を調製し 10^4 cells mL^{-1} で試験しても，増殖阻害はなかった。コロニーを藻類培養に直接添加すると 19 株の細菌が増殖阻害を示したので，クオラムセンシング機構が考えられた。*A. tamarense* に，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阻害剤 β-シクロデキストリンを加え，細菌株をコロニー状で接種すると，細菌 3 株でクオラムセンシング阻害が確認できたことから，この機構を通じて細菌が *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，有毒渦鞭毛藻 *A. tamarense* の増殖を阻害する細菌の生息がアマモ場で初めて見出され，その主要な分類群が明らかとなった。細菌による増殖阻害の機構についてクオラムセンシング機構を示唆しており，本研究の成果は, 健全で安定的な養殖二枚貝類の生産に貢献するものとして高く評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。