



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 <i>Alexandrium tamarense</i> の防除に関する生理生態学的研究 [全文の要約]
Author(s)	大西, 由花
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/55358
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Onishi_summary.pdf



学位論文内容の要約

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、フグ毒に似た強力な神経毒を生産し、濾過食者の二枚貝が摂餌し、麻痺性貝毒を体内に蓄積し、それを喫食した人が中毒する原因となる生物として知られる。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、予防策の確立は急を要している。近年、赤潮藻類を殺滅する微生物を用いた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も明らかになった。本研究は、北海道函館市臼尻のアマモ場、北海道東部に位置する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麻痺性貝毒原因種 *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。採集したアマモ葉体を用い、*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。著しい増殖阻害が認められた培養区画から、増殖阻害能の強い細菌株を選抜した。その結果、E8 株および E9 株という増殖阻害細菌が得られ、16S rRNA 遺伝子解析の結果それらが *Flavobacteri* に

属する細菌であることが判明した (相同性 100%)。また、それらとほとんど同じ 16S rRNA 遺伝子を持ちながら、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%) も存在していたことが分かった。

接種密度が及ぼす影響を評価するために、増殖阻害細菌 E9 株を、初期接種密度が 10^0 – 10^7 cells mL⁻¹ までの 8 段階になるよう、藻類を準備した試験管に添加し、クロロフィル *a* の蛍光値を測定して増殖をモニターした。その結果、全実験区において藻類の減少が確認できた。次に、藻類への攻撃型を特定するために *A. tamarense* 培養に E9 株を添加して増殖阻害を生じさせた後に濾液を調製し、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発生したことから、増殖阻害物質生産型の細菌であることが判明した。さらに渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*, ラフィド藻 *Chattonella antiqua*, *Fibrocapsa japonica*, および *Heterosigma akashiwo*, 珪藻 *Chaetoceros mitra* に対する E9 株の作用を検討したところ、*H. Circularisquama*, *Chat. antiqua*, *Chae. mitra*, *H. akashiwo* は増殖が阻害された。*F. japonica* は細菌の影響が明らかではなかった。

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 日にかけて、北海道厚岸郡厚岸町に位置する厚岸湖および厚岸湾 (南部と北部に 1 定点) にて、週に 1 回実施した。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。ヌクレポアフィルター (孔径 3.0 μm) 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) と区分した。FLB, PAB およびアマモ葉体表面の細菌培養シャー

レは、培養の後にコロニー数を計数し単離して、*A. tamarense* との二者培養試験に供した。増殖阻害細菌の密度は、アマモ葉体で約 10^6 CFU g⁻¹ wet leaf, アマモ場海水中からは約 10^3 CFU mL⁻¹, 厚岸湾からも頻度は低いが約 10^2 CFU mL⁻¹ の密度で検出され、湖内の増殖阻害細菌が湾内にも届いている可能性が考えられた。

3. 米国ワシントン州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 日にかけて、アメリカ合衆国ワシントン州サンファン諸島フライデーハーバー島および同州シアトル近郊のアマモ場 13 定点、ケルプ場 1 定点、沿岸のアマモと海藻のない 1 定点および沖合の 3 定点で行い、試料処理は厚岸での研究と同じ手法を用いた。*A. tamarense* に対する増殖阻害細菌は 5 定点のアマモ場から検出された。海水試料から検出されたのは Holmes Harbor (FLB), North Padilla Bay (PAB), Potlatch (PAB) であった。沖合の定点および沿岸域のアマモと藻のない定点からは増殖阻害細菌は確認されなかった。アマモ葉体試料から阻害細菌が検出されたのは、North Bay および Dumas Bay であった。アオサおよびケルプからは増殖阻害細菌は検出されなかった。

4. PCR 法による 16S rDNA 遺伝子解析

厚岸湖および厚岸湾から 54 株、米国ピュージェット湾から 7 株、計 61 株の増殖阻害細菌を単離し、これらの 16S rRNA 遺伝子の解析を、PCR 法に基づいて行った。

その結果、*α-Proteobacteria* (12 株, 19.7%), *β-Proteobacteria* (1 株, 1.6%), *γ-Proteobacteria* (19 株, 31.1%), *Cytophaga/Flavobacteria/Bacteroides* グループ (23

株 37.7%), *Actinobacteria* (4 株, 6.6%) および *Bacilli* (2 株, 3.3%) に分けられた。

中でも, α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* および CFB グループが特に高い割合を示し, 主要な分類群であることが分かった。

5. 単離細菌によるクオラムセンシング機構の検討

細菌 61 株を液体培地で培養し, 初期接種密度が 10^4 cells mL⁻¹ になるよう希釈して *A. tamarense* 培養に細菌懸濁液の状態で添加したが, 最初の二者培養 (コロニー状態で追加) 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 株のコロニーを希釈して懸濁状態とし, 初期接種密度が 10^4 cells mL⁻¹ になるよう *A. tamarense* 培養に添加したが, 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生じたことから, 増殖阻害はクオラムセンシング機構によると推定し, 検証実験を行った。

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 (AHL 類) を制御するクオラムセンシングの阻害剤として β -シクロデキストリンを終濃度 1, 10, 100 μ M になるよう添加した。その後, コロニーの状態の各細菌株を藻類培養に添加して, ターナー蛍光光度計で蛍光値を測定し増殖を調べた。その結果, AK12 株, AK14 株, AK24 株の 3 株で β -シクロデキストリンの添加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 AHL 類によるクオラムセンシングの機構で増殖阻害を行っていることが示された。

アマモ場は, 環境のバランスが変化すると崩壊しやすい, 脆弱性の高い生態系である。アマモ場を失うことは, アマモ場と他の生態系との重要な繋がりをも失うことになる。また, 土地の造成のため埋め立てなどにより, 広大なアマモ場が失われてきた。生態系を破壊し, 多様性を失わせるのではなく, アマモ場につ

いてはむしろ人為的に手入れを行い、高い生物多様性を維持する里海 (Sato-Umi) という概念を推進していく必要がある。本研究により、アマモ場には貝毒の原因となる有毒植物プランクトン *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。貝毒発生予防の観点から、有用二枚貝の増殖にとってアマモ場が重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後は、里海の観点に基づいて沿岸域の保全と有効利用に貢献し、美しく健全な沿岸環境を後世に伝える為に、水産業を育成する方向性を懸命に探る努力が必要であろう。