

赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、 赤潮動態予測法の開発（その2）

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所・准教授

[研究背景・目的]

『赤潮』は、真核性単細胞藻である赤潮原因藻が形成した群集である。赤潮原因藻には多くの種が知られ、赤潮構成種により、魚類弊死を惹起したり、産生する毒性物質が食用二枚貝に生体濃縮され、食中毒の原因となるなど、生態系及び水産業に影響をもたらす。通常時には、赤潮原因藻は低い細胞密度で他の様々な藻類と共存するが、何らかの原因により一種～少数種という限定された赤潮原因藻が増殖し、集積・優占することが多い。

現在までの生態学的研究により、水温・塩度・栄養塩濃度などの物理化学的因子が赤潮動態に与える影響について知見が蓄積されており、自然界における赤潮発生頻度は、高栄養塩環境や水温上昇とよく相関することが明らかになっている。一方で、環境で赤潮が形成された場合、その条件を実験室で人工的に再現して赤潮原因藻を培養しても、観察されるような高密度での増殖は観察されない場合が多い。つまり、上述の物理化学的要因以外に、未だに特定されていない異常増殖の誘発因子が存在するのでは？と推測される。

私たちは、この『未知の赤潮誘発因子』の候補として藻類に随伴する環境細菌に着目した。本研究では、特に大阪湾圏で発生が問題となっている魚類弊死を引き起こすヘテロシグマ（学名 *Heterosigma akashiwo*）と、二枚貝への毒性物質蓄積の原因となるアレキサンドリウム（学名 *Alexandrium tamarense*）に注目し、この2種の生理生態に影響を与える海洋細菌の単離同定を行うことを計画した。特に、これら2種の増殖を促進する細菌は、ヘテロシグマ赤潮およびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮を誘発する因子である可能性がある。この可能性に着目し、

Step 1：環境中で赤潮原因藻に随伴する細菌を単離同定

Step 2：赤潮原因藻増殖を促進する細菌を同定する

Step 3: これらの環境細菌に特有な遺伝子配列を同定し、赤潮発生を予見する遺伝子診断マーカーとして利用する可能性を探る

Step 4: 実際にこれらの環境細菌が赤潮を惹起する可能性を探索する

ことを計画した。

[研究方法]

R01年度は、Step1を行った。R02年度は、これらの細菌類より、ビタミンB類欠損や貧鉄状態など、貧栄養状態にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を特定し、そのメカニズムを理解することを目的として研究を行った（Step 2）。

1) 貧鉄・欠窒素・欠VB培地にてヘテロシグマ増殖を促進する細菌の同定

本研究では、広く使われている Modified SWM-III 培地を採用し、その組成を改変した培地での増殖を評価した。欠窒素培地では、硝酸塩を含まない SWM-III 培地を、欠 VB 培地では VB 類を含まない培地を作成した。また、貧鉄培地では、SWM-III 中の EDTA-Fe(水溶性が高く、遊離した Fe^{3+} が藻類に容易に取り込まれる)をリン酸鉄(III) (遊離性が低く、藻類に利用されにくい)に置換したものを作成した。これらを用いて、ヘテロシグマ、アレキサンドリウム、ヘテロカプサと昨年度単離同定した 47 株の細菌を共培養し、細菌の添加により藻類増殖が促進されるかを検討した。

また、細菌類が鉄キレート因子である siderophore 能を有するかを Chrome azurol S(CAS)による呈色反応にて検討した。さらに、一部の細菌株がオーキシシンなど植物ホルモンとして知られる一群の低分子化合物を生合成するかを予備的に検討した。

[結果と考察]

1) 異なる栄養条件下におけるヘテロシグマ及び他の赤潮原因藻類の増殖能への細菌の影響

ヘテロシグマは、 $\text{VB}_1 \cdot \text{VB}_{12}$ 要求性である。また、EDTA-Fe(III)を含有する SWM-III 培地ではヘテロシグマは順調に増殖するが、同じ Fe^{3+} 当量濃度のリン酸化鉄存在下では、ほとんど増殖しない。一般に、 Fe^{3+} 塩の分子種によって、藻類による利用効率が大幅に異なるが、利用効率の悪い Fe^{3+} 塩の藻類による利用を siderophore が促進することが知られている。これらの条件下において単離細菌を添加した場合に、ヘテロシ

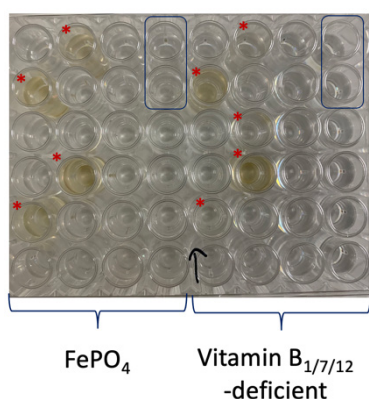


Fig 1 栄養欠損培地におけるヘテロシグマ増殖に対する海洋細菌株の影響

左側 4 縦列は貧鉄培地にて、右側 4 縦列は欠 VB 培地条件にて、各 well に異なる単離細菌株とヘテロシグマを培養し、三週間後に目視観察した (青四角で囲んだ well はヘテロシグマのみ培養)。顕著にヘテロシグマ増殖が観察される well では星印で示したように肉眼でも海水が褐色に着色したのが確認された。より軽微な増殖促進は、x10 の実体顕微鏡による観察で検証した。ほとんどの well においてヘテロシグマは四週間後に死滅したが、いくつかの well では六週間後にも高密度で生存し活発に遊泳するケースが見られた。

グマ増殖が変化するか (増殖促進は、添加した細菌がその代謝能により欠損成分を補完したためと考えられる) を検討した。単離株の多くが VB 欠損及び貧鉄状態を補完した (一部の結果を Fig 1 に示す)。貧窒素状態を顕著に補完する細菌は見られなかった。興味深いことに、VB を欠損した貧鉄培地においてヘテロシグマ増殖を促進する細菌が多く見られた。これらの細菌は、siderophore と VB 両方を産生する可能性が高い。

また、これらの細菌は、ヘテロシグマのみでなく、アレキサンドリウム とヘテロカプサの増殖も同じ培養培地条件で促進した。つまり、本研究で検討した限りでは、細菌類による増殖促進能は、藻類種特異性を示さなかった。

一方で、アレキサンドリウムへの増殖促進能については、興味深い知見を得た。本実験は、48-well プレートを用いて行ったことから、培養系のサイズは 1-mL 程度であ

った。培養容積が小さいため、ほとんどの藻類・細菌の組み合わせでは、培養開始後三週間から1ヶ月で、藻類増殖が停止し、その後溶藻→死滅という経過を辿る。しかし、特にアレキサンドリウム の場合、*Shewanella litoralis*#47 と *Roseicyclus marinus*#68 を添加した場合、1ヶ月以上の長期間にわたって藻類が増殖し、他の組み合わせに比べて藻類が遥かに高い密度まで増殖した。この原因は今のところ不明であるが、候補としては栄養塩類の効率的なリサイクルや、藻類の quorum sensing 関与分子、あるいは藻類増殖により蓄積する藻類への毒性物質の細菌による分解により、通常であれば存在する藻類増殖への密度障害が解除される可能性などが考えられる。つまり、これらの株については、VB 合成能および siderophore 合成能以外の何らかの代謝作用が藻類の継続的な増殖に寄与する可能性が高い。

2) 細菌による siderophore 合成能の評価

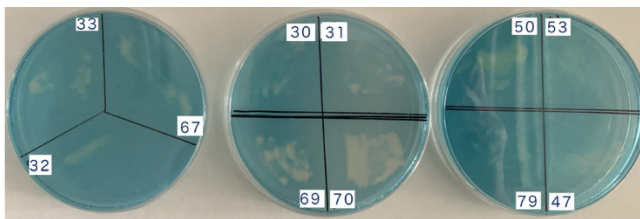


Fig 2 CAS assay による siderophore 検出 細菌により siderophore が産生されると、CAS に配位した Fe^{3+} が取り去られ、CAS の青色がオレンジ色に変化する。株により siderophore 産生能の多少があるのが検出できる。

細菌による siderophore 産生能を CAS 色素の変色を利用して検出した結果の一部を Fig 2 に示す。

興味深いことに、CAS 呈色反応では siderophore が検出される細菌で、藻類の増殖促進効果を持たないものが数株みられた。これまでの多くの研究により、細菌により合成された

siderophore が鉄あるいは他の金属イオンと結合した複合体は、藻類あるいは細菌が持つ特異的なレセプターにより取り込まれ、利用されることが知られる。CAS 呈色反応が陽性ながら藻類の増殖を促進しなかった細菌は、藻類がレセプターを持たないタイプの siderophore を産生する可能性がある。

3) siderophore と VB 類以外の特徴的な細菌代謝物について

藻類の増殖を促進する細菌として、siderophore 合成細菌や VB 類合成細菌に加えて、IAA を合成する細菌が知られる (IAA による藻類増殖促進の機序はいまだに不明)。特に、1)にて長期間にわたってアレキサンドリウム の高密度増殖を支持した *Shewanella litoralis* #47, 異なるサンプル地点より複数回にわたって得られたヘテロシグマ随伴細菌で、栄養欠損培地にてヘテロシグマ・ヘテロカプサ・アレキサンドリウム に増殖促進効果が見られた *Jannaschia cystaugens* #61、*Alteromonas marina* #62、*Planctobacterium marinum* #6 について、IAA などを含む植物ホルモン類の生

産能を調べた (Fig 3)。代表的な植物ホルモンとしては、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシジン酸、ブラシノステロイド、ジャスモン酸が知られている。これらのうち、今回計測に供した 5 株について、IAA およびサイトカイニン (ゼアチン= Fig3 tZ とイソペンテニルアデニン=Fig3 iPA) を産生するが、他の分子種は産生しないことが明らかになった。長期間にわたってアレキサンドリウム の高密度増殖を支持する *Shewanella litoralis* #47 と他の種の間、特徴的な違いは見られなかった。

[結論と今後の展望]

本研究により藻類増殖を特に貧栄養状態で促進する可能性の高い細菌が単離されたことは、一般的に言われる『富栄養状態』でなくとも赤潮を誘発しうる因子の候補として興味深い。

また、特に、近年、アレキサンドリウム の高密度化が報告されているが、その原因は依然明らかでない。本研究で同定した、長期間にわたり共培養系でアレキサンドリウム の高密度までの増殖を促進する細菌類が、自然界での高密度化に関係している可能性は、新年度の課題として検討する。

さらに本年度は、予備実験的に、藻類増殖を促進する細菌類の植物ホルモン産生能を検討したところ、分子種限定的に産生活性を確認した。報告は少ないものの、植物ホルモン、特に IAA は藻類増殖促進に関わるという報告がある。今後は、藻類と共培養した場合の植物ホルモン産生能について検討するとともに、増殖促進能を示さない細菌類 (*JMIV_s* (種未同定), *Neptuniibacter halophilus*, *Nereida ignave*, *Oceanospirillum sanctuarii*) との比較も行う。

本年度までの研究結果に基づき、来年度は、同定した細菌類による赤潮原因藻増殖促進の機序解明を試みる (Step2 続き)。また、増殖促進細菌のゲノム配列解読とアノテーションを完了し、特に藻類の増殖促進に関連する遺伝子群を特定する (Step3 進行中)。発生した赤潮サンプル中の細菌類 を 16S メタバーコーディング法にて検出同定すると共に、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析あるいは qPCR/qRT-PCR 法を利用して、赤潮サンプルに多く含まれる細菌由来遺伝子あるいは遺伝子転写物より、特に VBs 生合成系あるいは siderophore 合成系に関連する細菌由来遺伝子を検出することで、海水中に存在する『赤潮形成促進細菌』類の検出・定量への応用 (Step 4) を試みる。

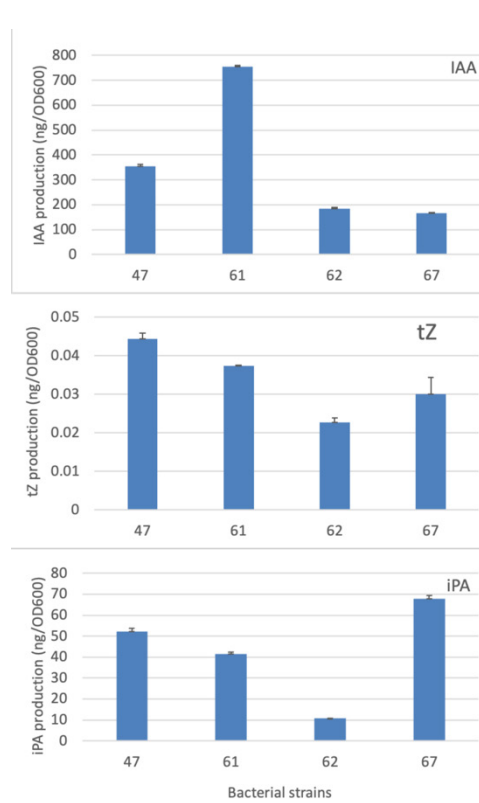


Fig 3 細菌による各種植物ホルモンの生合成能