

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

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所 准教授

1. 本研究の背景

『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。

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、上述の物理化学的環境因子以外に、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。

珪藻や緑藻の増殖を、環境細菌が促進するという研究は多く知られる。例えば、珪藻と海洋細菌である *Sulfitobacter* の一種が結合し二種間でチロシン代謝物を交換・利用することで相利的に共生するという例が知られている。また、藻類の多くはビタミン B12 を生合成する能力を持たない。これらの藻類は、ビタミン B12 を生合成する細菌により種非特異的に増殖が促進される。さらに、鉄イオンは、多くの場合藻類の増殖を律速する因子となるが、鉄イオンの藻類への取り込みは、ある種の細菌が作るシデロフォアという低分子化合物に促進される。これらの例に見られるような細菌類が赤潮原因藻増殖の自然環境における促進因子として作用する可能性があるものの、このような観点に立った赤潮原因藻と環境細菌の相互作用についての研究は、ほとんど例がない。

私たちのグループは海洋細菌の一種 *Altererythro bacter ishigakiensis* の赤潮原因藻の一種であるヘテロシグマ (学名 *Heterosigma akashiwo*) に対する増殖促進作用を見出した (*Harmful Algae*, 2016, Higashi *et al*)。ヘテロシグマと *A. ishigakiensis* の共培養により、ヘテロシグマ増殖は加速し、最高培養密度が増加した。一方、この

細菌はヘテロシグマの近縁種シャトネラの増殖には影響しなかった。つまり、既に報告がある海洋細菌のビタミン合成能を介した非特異的増速促進とは異なり、*A. ishigakiensis* は種特異的な増殖促進作用を持つといえる。この結果は、海洋細菌の増殖促進作用が、特定の赤潮原因藻種の増殖を惹起する要因（赤潮発生の外的要因）の一つである可能性を示唆する。赤潮発生における海洋細菌・赤潮原因藻間の相互作用に着目した研究例は非常に少ない。そこで、この点を追求するために本研究を計画した。

2. 研究目的

上述のように、私たちのグループは、ヘテロシグマの増殖を種特異的に促進する海洋細菌 *A. ishigakiensis* を単離した。この結果は、物理化学的環境要因に加えて、環境中の海洋細菌が赤潮発生の一因として重要な役割を担うことを示唆する。そこで、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 タマレンセ（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、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウムに随伴する細菌を単離し、特に、この2種に対する増殖促進作用を有する細菌を特定する。さらに、これらの細菌のゲノム配列を解読し、種特異的なマーカー配列を決定することができれば、赤潮を予見する分子マーカーとしての応用が可能となる。そこで、このようなマーカー配列の開発を視野に入れた研究を計画した。

また、すでに私たちが単離した *A. ishigakiensis* がヘテロシグマ増殖を促進する作用機序を検討した。新たな赤潮原因藻と環境細菌の相利的相互作用についての知見を得ることで、赤潮原因藻と環境細菌間の相互作用のより普遍的な理解に繋がると考えたためである。

3. 研究方法

まず、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの生理生態への影響を有する海洋細菌を単離することを目標として、1)・2)の研究を計画した。

1) ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセに随伴する細菌の単離

一般的に、ヘテロシグマ赤潮は5月より7月初旬に、アレキサンドリウム タマレンセによる赤潮は1月下旬～3月上旬に観察される。ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮形成期に海水を採取し、その海水より両藻細胞を単離し、随伴細菌を単離することで赤潮形成を促進する細菌を探索すること

を計画した。

2) 貧栄養状態のヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する海洋細菌の選択的単離及び同定

1) のアプローチは、環境中で赤潮形成時に随伴する細菌を単離することから、実際に赤潮発生の原因となる細菌の単離に繋がる可能性が高い。一方で、赤潮が発生しなければ、上述の実験を行うことができない点が致命的である。そこで、赤潮が発生していない状態の海水から、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する細菌をスクリーニングすることとした。

研究背景に述べたように、珪藻や緑藻などの増殖を促進する細菌として、藻類が合成能を持たないビタミン類を生合成する細菌や、あるいは藻類への鉄イオンの取り込みを補助する因子であるシデロフォアを生合成する細菌が知られている。ヘテロシグマやアレキサンドリウムに同様の作用を有する海洋細菌が海水中に存在する可能性を検討するために、無菌化したヘテロシグマやアレキサンドリウムに天然海水をごく少量添加し、貧栄養状態で培養したにも関わらず藻類の増殖が促進された場合に、海水中に存在する細菌のうち藻類の増殖に寄与する細菌を選択的に単離できる可能性が高い。そこで、これらの藻類に付着している海洋細菌の単離同定を試みた。

[具体的な細菌単離方法]

1)・2)ともに、キャピラリーを用いて藻細胞をピックアップし、滅菌した人工海水で穏やかに洗浄した。その藻細胞を水槽式超音波処理器にて破碎後、海洋細菌用寒天培地 (Difco Marine Broth 2216) に塗抹し、摂氏 25℃にて数日培養した。海洋細菌のコロニーをピックアップし、数回寒天培地に塗抹することで、シングルコロニーにクローニング (単離) したのち、バクテリア 16S rRNA 配列をユニバーサルプライマーにて増幅し、サンガー法にてシーケンスを行うことで種同定を行った。

3) ヘテロシグマ増殖促進能を有する海洋細菌 *A. ishigakiensis* のヘテロシグマ生理生態への影響についての検討

A. ishigakiensis がヘテロシグマ増殖を促進する機構についての知見を得ることを目標として、いくつか予備的な実験を行なった。*A. ishigakiensis* の特徴として、高い抗酸化作用を有するカロテノイドであるアスタキサンチン (以下 AST) を蓄積することがあげられる。さらに、AST の生合成過程では、葉緑体の光障害を軽減するカロテノイドであるゼアキサチンを生成する。この点に着目して、ヘテロシグマの光合成活性に *A. ishigakiensis* が及ぼす影響をパルス変調蛍光光度計 (PAM) にて解析した。

4. 結果と考察

1) 赤潮原因藻からの随伴細菌の単離・同定

本研究でフィールドとしている海域では、2019年～2020年に、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮は報告されなかった。一方、2020年2月下旬になって、高知県浦ノ内湾にてヘテロシグマが 20,000 cell/ml まで増殖が見られたため、サンプルを取得し、ヘテロシグマに付着している細菌を単離した。3月27日現在、24株を得て種同定中である。

2) 貧栄養状態のヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する海洋細菌の選択的単離及び同定

ヘテロシグマについては、6月・7月に播磨灘より採取した海水を用いて実験を行なった。鉄欠乏培地、ビタミンB12欠乏培地を作成し、当グループで保有する無菌化ヘテロシグマ株 H93616 に上述の海水を添加して培養を行なった。ともに、海水非添加区に比べて優位にヘテロシグマ増殖が促進されたサンプルが見られたため、その実験区よりヘテロシグマをピックアップし、含有細菌を単離同定した。

鉄欠乏状態ヘテロシグマより 47 株、ビタミン B12 欠乏ヘテロシグマより 37 株（1 株は同定できなかった）、合計 84 株の細菌を得た。それぞれの栄養欠乏状態で異なる種の細菌がヘテロシグマに随伴していたことが明らかとなった。この結果は、同じ藻類であっても、栄養状態によって選好する海洋細菌が異なることを示している。

3) ヘテロシグマ光合成機構に対する *A. ishigakiensis* が与える影響の評価

赤潮形成時のヘテロシグマは、海表面に集積する。真夏の晴天時の海表面の日光照度は $\sim 2000 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ と非常に強く、赤潮形成時のヘテロシグマが、葉緑体に対する光損傷に高い抵抗性を持つことを示す。無菌化したヘテロシグマに *A. ishigakiensis* を添加して2日間培養したのち、葉緑体の光特性をPAMにて解析したところ、葉緑体が過剰な光を熱として逃す機構である非光化学的消光が著しく活性化することを発見した。

5. 結論と今後の展望

本年度の研究により、ヘテロシグマが環境中で随伴する細菌を合計 108 株単離し、それぞれの種について、無菌化したヘテロシグマの増殖速度に影響を与える可能性について検討を行なっている。また、単離されたそれぞれの種の全ゲノムを解読・解析するための準備を進めている。さらに、過去に単離したヘテロシグマ増殖を促進する随伴細菌 *A. ishigakiensis* は、ヘテロシグマの光合成機構の強光耐性を増強することが明らかとなった。この知見は、赤潮動態予見にカロテノイド産生海洋細菌の分子マーカーとして利用できる可能性を示している。この点をさらに追求する。