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３）

植木 尚子
岡山大学 資源植物科学研究所 准教授

[研究目的]

赤潮は今でも大阪湾でアサリ毒化や畜養ハマチの大量斃死など、水産業への多くの被害を引き起こしており、赤潮発生機序の理解は喫緊の課題である。赤潮は原因となる植物プランクトンの異常増殖によって起こる。赤潮発生には、海水の富栄養化や水温上昇が関与するとされるが、依然として不明な点も多く残される。申請者は、海洋細菌が、共生的な気候を介して赤潮原因藻の増殖を促進する可能性に着目し、R01 年度より本助成を受けて、赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定し、それらの存在を診断材料とすることで、赤潮動態予測法の開発の端緒とすることを目的とした本研究を開始した。R01・02 年度は、特に貧鉄（Fe）条件、あるいはビタミン B_{12}（VB_{12}）欠損条件にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を見出した。赤潮原因藻増殖は、栄養塩濃度に大きく影響を受けるが、海水中の溶存栄養素だけではなく、海底泥に含まれる含窒素・リン化合物にも依存するとされてきた。そこで、本年度は、赤潮が頻繁に報告される大阪湾や播磨灘などの海域より底泥を採取し、その中に生息する細菌より、特にリン欠損下にて赤潮原因藻増殖を促進するものを単離・同定を試みた。

[研究方法]

1 細菌単離方法

大阪湾より大阪府立環境農林水産総合研究所の協力により採泥した。当初の予定では、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウムの増殖が顕著な時期に採水・採泥を行うつもりであったが、2019～2022 の間にアレキサンドリムが顕著に増殖する事態には至らなかったため、ヘテロシグマが水域に数百細胞程度みられた際の底泥を主に実験に供した。

底泥 0.1 g を滅菌海水 1 mL に懸濁し、その懸濁液を 1/10, 1/100, 1/1000 希釈し、100 µl ずつ x1/5 Marine Broth 2216 プレートに添付し、微好気性および好気性条件下で数日培養した。得られたコロニーをさらに数回移植培養を繰り返し、シングルコロニーにし、１６S 配列を解読し、簡易的に種同定を行った。

2 共培養実験

培地は、市販の人工海水をフィルター滅菌したものに、微量元素・栄養素を添加するために、基本的に IMK を規定量の 1/10 添加した。リン欠損培地は、IMK よりリンを除いた組成のものを用いた。

ヘテロシグマは当研究室で確立した株を、アレキサンドリウムおよびヘテロカプサは国立環境研究所より株を取得して実験に供した。シャトネラ、スケレトネマ、キートセロスは広島大学小池研究室より供与された。共培養に先立って、藻類はリン欠損培地に5倍希釈し、4日間培養したものを用いた。また、細菌は、まずMarine Broth 2216にてOD_{600} > 2に到達するまで培養し、その後培地を添加物なしの人工海水に換え、2日間培養した。2日後に遠心で細菌を回収し、人工海水にOD_{600} = 0.02に懸濁し、藻類に対して体積の 1/20 量の細菌懸濁液を添加し、共培養した。藻類細胞数はMoxi-Z Cell Counterにて計数した。

3 ヘテロシグマによる *V. comitans* 貪食能の評価

V. comitans を生細胞を染色する色素Cell Trackerで蛍光染色し、リン欠損培地で4日間培養したヘテロシグマに添加し、蛍光顕微鏡下でヘテロシグマへの *V. comitans* の取り込み・蓄積が起こるか精査した。

[結果と考察]

1 ヘテロシグマ増殖を促進する細菌の単離

底泥より細菌株を複数単離し、これらの株それぞれとヘテロシグマを共培養実験したところ、顕著なヘテロシグマ増殖促進が2株に観察された。種同定により、これらの株は *V. comitans* と *Photobacterium marinum* であることが明らかとなった。特に増殖促進能が高い *V. comitans* の藻類促進能についてより詳細な検討を重ねた。*V. comitans* の藻類促進能について、他の *Vibrio* 属細菌と比較した結果を示す（Fig 2）。今回の実験では、*V. comitans* 以外に顕著に増殖促進作用を示す *Vibrio* は見出されなかった。概要では図は省略するが、*V. comitans* によるヘテロシグマへの増殖促進作用は、L:D = 12h:12hの明暗条件下ではみられるが、一方、24h暗条件ではみられなかった。これは、ヘテロシグマが *V. comitans* より取り込んだリンを光合成によって同化する必要があることを示している。

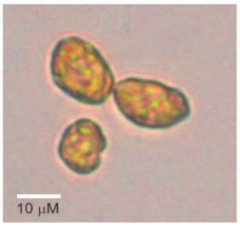

図1 ヘテロシグマ

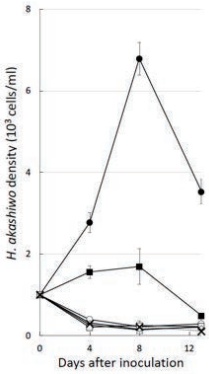

Fig. 2 *H. akashiwo* propagation with *Vibrio* genus bacteria under the orthophosphate-depleted condition. The cell numbers of *H. akashiwo* cultured with (solid lines) or without (broken line) bacteria pre-cultured in MB (A) under orthophosphate-depleted condition were measured. *V. comitans*, closed circle; *V. rotiferianus*, open rhombus; *V. owensii*, open circle; *V. alginolyticus*, open triangle; *V. campbellii*, open square; a Vibrio genus strain isolated from Chilean coastal water, closed square. The data are presented as mean ± standard deviation (S. D.) of triplicate cultures measured twice. The experiments were repeated three times, and the representative results were presented.

2 ヘテロシグマは *V. comitans* を貪食する

蛍光標識した *V. comitans* とヘテロシグマを共培養すると、ヘテロシグマへの *V. comitans* 取り込みが観察された（Fig 3）。本実験にて *V. comitans* 標識に用いたCell Trackerは、生細胞を標識することから、取り込まれた *V. comitans* は、破壊されることなくヘテロシグマに取り込まれる、つまり生細胞として貪食されることを示す。

近年、多くの研究により、藻類の細菌貪食あるいは粒状物質(死細胞など)貪食能が示されている。細菌貪食は、特にリン欠乏条件下で多く観察されてきたが、特異的な細菌種による藻類の増殖状態の変化は報告された例はなく、本研究は新しい知見を提供するものと言える。

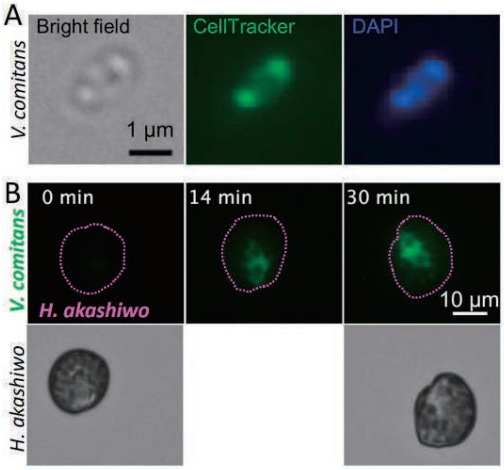

Fig 3 Bacterivory of *H. akashiwo*. *V comitans* was stained with Cell Tracker (green fluorescence), and the *H. akashiwo* cultured with stained *V. comitans* for indicated periods were visualized.

3 *V. comitans* は多様な藻類の増殖を促進する

現在までに、珪藻であるスケレトネマとキートセロス、渦鞭毛藻であるヘテロカプサ、アレキサンドリウム、ラフィド藻であるヘテロシグマとシャトネラに対するリン欠乏下での *V. comitans* の影響を検討した。その結果、*V. comitans* をリン欠乏下のシャトネラとアレキサンドリウムに添加しても藻類の増殖はほぼ促進されないが、この2種以外の藻類については、全て増殖が促進された。

ヘテロシグマ以外の藻類が、本細菌を貪食するか否かについてはいまだに不明であるが、同じ細菌でも、増殖を促進する藻類としない藻類があるという点は非常に興味深い。

4 増殖促進能に関係する遺伝子の同定による遺伝子マーカー選定の可能性の探究

ヘテロシグマやヘテロカプサなどが、*V. comitans* を貪食することによって、どのようなリン源を摂取しているのかについては、未だ検討中であるが、特に、細菌中に蓄積されたポリリン酸（オルトリン酸のポリマー）を有力な候補として考えている。ポリリン酸は、オルトリン酸単位間の高エネルギー結合によりエネルギー蓄積性が高いとされ、また、加水分解されればオルトリン酸として、光合成に利用され得る。多くの細菌がポリリン酸蓄積能をもつとされ、Vibrio 属細菌も、ポリリン酸合成に必要とされるポリリン酸キナーゼ(polyphosphate kinase, PPK)を有する。図2に示したように、複数の Vibrio 属細菌のうち、顕著な藻類増殖能を示したのは *V. comitans* のみであった。そこで、*V. comitans* が保有する PPK が他の Vibrio 属細菌が有する PPK とは異なる性質を持つ可能性を検討するために、Vibrio 属細菌の有する PPK について網羅的な系統解析を行

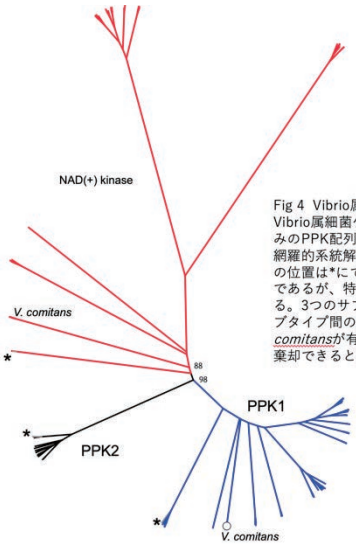

Fig 4 Vibrio属PPK系統樹　R03年10月にNCBIより入手できる全Vibrio属細菌ゲノム配列を入手し、Vibrio属および他属にて同定済みのPPK配列への相同性（e-value = 1e-10）を元にPPKを同定し、網羅的系統解析を行った。他族細菌より同定された3タイプのPPKの位置は*にて示した。Vibrio属PPKは3つのサブタイプに分類可能であるが、特に*V. comitans*はNAD(+)kinaseと PPK1タイプを有する。3つのサブタイプ間のBootstrap値は88, 98と高いものの、各サブタイプ間の分岐はそれほど支持されるものではなく、*V. comitans*が有する藻類増殖能が特異なPPKを持つためという仮説は棄却できると見られる。

った（Fig. 4）。結果として、*V. comitans* が保有する PPK 配列は、ヘテロシグマへの増殖促進作用を示さない他の Vibrio 属細菌の PPK 配列より顕著な違いは見られなかった。以上より、*V. comitans* PPK をマーカーとする戦略は（例え予想どおりにポリリン酸がヘテロシグマ増殖の原因物質だとしても）無効と判断した。

［結論］

藻類の増殖は、窒素（N）、P、Fe などに制限される。また、赤潮原因藻の多くは VB_{12} 類を要求性である。そのため、海水中のこれらの物質の濃度は、水域の赤潮原因藻増殖キャパシティを決定すると考えらえる。特に、N, P はマクロ必須栄養素として、赤潮原因藻増殖を大きく左右するとされ、溶存無機 N や溶存無機 P として、各地の水産研究所などの公的機関で継続的にモニタリングされている。一方で、底泥も含めた環境中には、有機型や不溶型の N・P も多く含まれ、有機 P や有機 N などを利用可能な藻種も存在する。以上の点に加え、近年、多くの緑藻が細菌類を貪食することが明らかにされつつある。以上の点を鑑みて、本年は、赤潮原因藻が細菌を貪食し、細菌中の有機 P 化合物を利用する可能性に着目して、底泥中の細菌類が P 欠乏条件下で赤潮原因藻増殖を促進する可能性を追求した。その結果、本年度は、P 欠乏条件にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を見出した。

特に N・P は赤潮発生の可能性を規定する上で重要な栄養素であるとされ、細菌が蓄積したと見られる P を赤潮原因藻が利用可能であるという知見は斬新なものである。一方で、私たちは、３年間にわたり、N 欠乏条件で赤潮原因藻増殖を促進する細菌の探索を続けてきたが、結局見出すことができずに終わった。私たちは、特に、赤潮原因藻に随伴して、ガス態 N_2 をアンモニアに変換する N_2 固定細菌に特化したスクリーニングを行ってきた。N_2 固定細菌は、空気中に膨大な量存在するガス態 N_2 を植物プランクトンなどの光合成作用を介して食物連鎖に取り込むという意味で非常に重要な存在である。一方、すでに化成肥料や産業排水などによりある程度以上の窒素化合物が環境中に存在する大阪湾などの環境では、N_2 固定細菌よりもむしろ、有機 N を赤潮原因藻が利用可能な形に変換する代謝能を持つ細菌類を探索するべきであると考えている。

本研究を行った３年間の間、大阪湾において継続的に赤潮発生状態のモニタリングを行なっている大阪府立環境農林水産総合研究所の協力を仰ぎ、サンプルの収集に努めたが、赤潮原因藻が特筆すべき密度まで増殖した状態には遭遇できなかった。このため、環境中の細菌叢構成の変動に着目した解析は行うことができなかった。一方で、私たちが同定した *V. comitans* は、数多く知られる *Vibrio* 属細菌のうち、例外的に P 欠乏条件下にて赤潮原因藻増殖促進能をもつ可能性がある。今後は、より多くの *Vibrio* 属細菌の赤潮原因藻増殖への影響を探るとともに、*Vibrio* 属細菌のゲノム配列の比較解析により、P 欠乏条件下における赤潮原因藻増殖の原因物質の特定と、その配列を利用した環境評価マーカーの作成の可能性の探索を継続する。