

修士論文内容の要旨

ふりがな	おおにし ゆか	
氏名	大西 由花	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 21 年 4 月	
指導教員名	主査 今井一郎教授	副査 澤辺智雄教授 副査 山口 篤准教授
論文題目	有毒渦鞭毛藻 <i>Alexandrium tamarense</i> の増殖阻害細菌の生理生態学的研究	

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、濾過食者の二枚貝に摂餌され麻痺性貝毒を生じる生物として知られる。規制値を上回る貝毒 ($> 4 \text{ MU g}^{-1}$ 可食部) が検出されると、貝の出荷は自主規制され、養殖業者が受ける経済的損失は非常に大きく、また規制が解除された後も風評被害に悩まされることが多い。さらに、稚貝の種苗の移動放流などにより、貝毒発生水域の分布拡大および発生件数の増大が認められるため、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いる。中でも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という事実の発見は重要である。*A. tamarense* は元来、親潮を中心とした寒流域に高密度で分布するという特徴を持ち、北海道では貝毒の発生件数が極めて多い傾向にある。本研究では、北海道のアマモ場において *A. tamarense* に対する増殖阻害細菌を探索し、強い効力を持つ細菌の増殖阻害特性を検証した。

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の港内で行った。同港内にはアマモが繁茂しており、先端に採集金具の付いた棒を用いてアマモを採集した。試料をポリプロピレン容器に採集し、実験室へ持ち帰った。滅菌処理をしたショット瓶に入れ替え、滅菌濾過海水 (200 mL) を加えて 500 回強振し、葉体表面のバイオフィルムと共に細菌を剥離した。強振後の海水をヌクレポアフィルター (孔径 $1.0 \mu\text{m}$) で濾過し、濾液を *A. tamarense* を対象としたマイクロプレート MPN 法に供した。微細藻類の培養には改変 SWM-3 培地を用い、光強度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、明暗周期 14h L: 10h D、温度 15°C の環境で実験を行った。マイクロプレート MPN 法にて増殖阻害が確認されたウェルの培養を、高密度の *A. tamarense* に接種し、再び増殖阻害を生じさせる集積培養を行った。増殖阻害がみられた試験管の培地を、白金耳を用いて 10^{-1} 寒天培地に塗抹し、コロニー形成後に細菌を単離した。以上の方法で細菌 23 株を単離し、増殖阻害活性の高いものをスクリーニングした。また、PCR 法により、16S rRNA の部分塩基配列の解析を行った。その結果 *A. tamarense* に対して強い増殖阻害作用を示した細菌 2 株 (E8 株: 近縁種 *Ruegeria atlantica*, E9 株: 近縁種 *Flavobacterium* sp. 5N-3)、それらと同じ塩基配列を持ちな

がら増殖阻害作用を示さない細菌 2 株 (E5-1 株: E8 株と同じ, E11 株: E9 株と同じ) を実験に用いることとした。

まず, *A. tamarense* 増殖阻害細菌 E8 株および E9 株の接種密度が及ぼす影響を評価するための実験を行った。ST10⁻¹ 液体培地に, E8 株および E9 株を増殖させ, 初期接種密度が 10⁰–10⁶ cells mL⁻¹ の 4 段階になるよう希釈し, 試験管に用意した *A. tamarense* (3.6 x 10³ cells mL⁻¹) に添加した。先に述べた *A. tamarense* 培養条件と同様の環境で 20 日間培養し, 蛍光値を測定した。その結果, コントロールの蛍光値は 5.62–20.1 まで増殖した。一方, 4 段階設けたいずれの細菌株添加区でも明らかな増殖阻害が確認された。以上より, 細菌 E8 株および E9 株の増殖阻害能は, 細菌の細胞密度に依存しないことが分かった。

次に, *A. tamarense* 増殖阻害細菌 E8 株および E9 株の攻撃特性を検討するための実験を行った。高密度に培養した *A. tamarense* (3.0 x 10⁴ cells mL⁻¹) を三角フラスコに用意し, ST10⁻¹ 液体培地に培養した細菌 E8 株および E9 株を, 初期接種密度 10⁴ cells mL⁻¹ になるよう三角フラスコへ接種した。3 日間培養して増殖阻害を起こさせ, DAPI 染色による直接計数法により, それぞれの細菌の増殖を確認した。その後, シリンジフィルター (孔径 0.1 μm) で濾過して細菌を完全に除去した。濾液を, 50% および 80% の濃度に希釈し, *A. tamarense* (3.0 x 10³ cells mL⁻¹) に添加した。その結果, コントロールの蛍光値は 5.3–14.1 まで増殖したが, E8 株および E9 株の濾液添加区においては, いずれの濾液濃度でも増殖阻害が確認された。以上より, E8 株および E9 株は殺藻物質を産生する細菌であることが分かった。

A. tamarense に対する増殖阻害細菌 E8 株および E9 株が, 赤潮藻類に対しても同様の効果を与えるのか, またそれらとほぼ同じ遺伝子を持ちながら *A. tamarense* に対する増殖阻害能を示さない E5-1 株および E11 株の影響を検討するための実験を行った。ST10⁻¹ 液体培地にて増殖させた *A. tamarense* 増殖阻害細菌 E8 株および E9 株, 増殖阻害能を示さない細菌 E5-1 株および E11 株を, 赤潮藻類 4 種 (*A. tamarense*, *Heterocapsa circularisquama*, *Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo*) に添加した (初期細胞密度 10⁴ cells mL⁻¹)。 *A. tamarense* は先に述べた培養条件と同じ環境で培養し, その他の微細藻類は温度 20 °C の環境で実験を行った。 *A. tamarense* の結果をみると, コントロールは 2.53–53.2 まで増殖した。 *R. atlantica* と近縁と認められた増殖阻害細菌 E8 株添加区, および増殖阻害能を示さない細菌 E5-1 株添加区の結果を比較すると, 後者の蛍光値は 2.44–68.1 へと増加していたが, 前者では 2.44–4.82 であり, 著しい増殖阻害が起こった。同様に, *Flavobacterium* sp. 5N-3 と近縁の増殖阻害細菌 E9 株添加区, および増殖阻害能を示さない細菌 E11 株添加区の結果を比較すると, 後者の蛍光値は 2.44–65.4 へと増加していたが, 前者では 2.44–3.91 という結果になり, 同様に阻害が認められた。赤潮藻類 *H. circularisquama*, *C. antiqua*, *H. akashiwo* についても同様の蛍光値の変動が観察されたが, *A. tamarense* に対する程の増殖阻害は確認されなかった。以上より, E8 株および E9 株の増殖阻害能は *A. tamarense* に対して特に強く発揮されること, 同種と判断された細菌でも能力に差があることが判明した。

本研究によりアマモ場が *A. tamarense* 発生の予防能力を有すると評価された。今後は, より広大なアマモ場において *A. tamarense* 増殖阻害細菌について研究を展開することにより, 健全で安定的な二枚貝類の生産を支える方策を探る必要がある。