

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：35409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12625

研究課題名(和文) 海洋細菌の活性を利用したアポトーシスの誘導によるノリ色落ち原因珪藻の防除技術開発

研究課題名(英文) Developmental research aimed at prevention of diatom blooms that cause bleaching of aquacultured Nori by using a marine bacterium possibly having the ability to induce cell death of diatoms

研究代表者

満谷 淳 (MITSUTANI, Atsushi)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：80309632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、有明海でノリ養殖に被害を与えている珪藻赤潮を海洋細菌の殺藻活性を利用して抑制する技術の開発を目指して行い、以下の成果を得た。1) 有明海から分離した細菌A25株を珪藻の無菌培養液に接種すると、珪藻細胞が細胞膜の剥離、核DNAの断片化、細胞の収縮という高等植物細胞のプログラム細胞死と同様の過程を経て死滅することを明らかにした。2) A25株を増粘多糖類のゲルで高密度で粒状に固定化して珪藻の培養液に添加すると珪藻細胞が1)で述べた過程を経て死滅することを示した。固定化により沿岸海域において局所的にA25株を高密度に保つことが可能となり、珪藻赤潮抑制技術の実用化に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)： This research was conducted to aim at the development of prevention technology of diatom blooms that cause bleaching of aquacultured Nori by using diatom-lytic marine bacteria. The results are as follows: 1) It was observed that diatom cells are lead to death with the cell changes including blebbing, chromosomal DNA fragmentation, and cell shrinkage which are known as the characteristic phenomena of programmed cell death in higher plants, when co-cultured with a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25. 2) It was confirmed that strain A25 reveals the activity to induce the cell death of diatom, even when inclusively immobilized in the gel of thickening polysaccharides like glucomannan, etc.. It is expected that inclusively immobilizing technology enables us to keep the cell density of diatom-lytic bacteria like strain A25 high enough to induce the cell death of bloom-forming diatoms, locally in the coastal sea area where Nori farming is carried out.

研究分野：環境微生物学

キーワード：赤潮防除 珪藻赤潮 ノリ色落ち 殺藻細菌 プログラム細胞死 包括固定化 固定化担体

1. 研究開始当初の背景

有害微細藻類の異常増殖現象である赤潮は、瀬戸内海では水質の改善などにより 1970 年代の 1/3 程度にまで減少したが、現在でも赤潮による被害は毎年発生し、水産業、特に養殖の現場ではその対策への期待は高い。赤潮対策のうち、赤潮原因藻のモニタリングを基盤とした発生予察と現場への連絡体制は整備されてきているのに対して、発生した赤潮を制御、消滅する技術については、ニーズは高いものの実用化への技術開発は進んでいない。

ところで、赤潮の消滅時には原因微細藻を殺滅する細菌(殺藻細菌)の密度が上昇することが現場海域での調査で明らかとなり、殺藻細菌が赤潮消滅に関与している可能性が指摘されている。そして、日本及び海外の研究者によって渦鞭毛藻、ラフィド藻、珪藻など各種赤潮原因藻に対する殺藻細菌が分離されてきた。自然界に存在する微細藻と細菌の間の生物間相互作用を拡大利用する生物的处理により赤潮消滅を誘導することで、環境へのインパクトを最小限に抑えつつ赤潮による被害を低減できることが期待される。一方で、殺藻細菌を活用した赤潮防除の確立の基盤となる殺藻細菌の赤潮原因藻の殺藻機構については知見が乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

ノリ養殖は栄養塩の豊富な海域で行われるが、豊富な栄養塩はノリだけでなく珪藻の増殖をも促すため、ノリ養殖が盛んな有明海などでは養殖時期の冬季に珪藻赤潮が頻発している。ひとたび珪藻赤潮が大発生すると、珪藻との栄養塩の競合によってノリが栄養失調となって変色する「色落ち」が起き、ノリ養殖業に甚大な被害を及ぼしている。

本研究は、有明海から分離した殺藻細菌の珪藻細胞を溶解・死滅させる過程が、過去に報告されている定常期になるとアポトーシス様の自己溶解を起こす珪藻株の死滅過程とよく一致していることに着目し、この細菌の産生する物質が珪藻のアポトーシスを誘導する条件並びにメカニズムを明らかにすることを目的とした。それによって、従来の粘土吸着等の環境に対するネガティブな影響が大きな方法に代わる「環境にやさしい」珪藻赤潮防除技術の開発につながる極めて有用な情報が得られると考えられる。

また、本研究では殺藻細菌を用いた生物的赤潮防除法の実用化に向けて、殺藻細菌を高分子ゲルに包括固定化し、固定化担体を用いた珪藻の自己溶解誘導のシミュレーション実験を培養レベルで行い、その効果を検証することも目的とした。

3. 研究の方法

当研究グループは、珪藻スケルトネマ・コスタツムを殺藻する細菌を 30 株あまり有明

海から分離している。それらの殺藻細菌の中で珪藻のアポトーシス様の自己溶解を誘導する活性が最も高いシュードアルテロモナス属細菌 A25 株を本研究に用いた。

(1) 殺藻細菌による珪藻死滅過程の検討

殺藻細菌 A25 株と無菌培養の珪藻スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株とを二者培養し、経時的に生細胞を判別するニュートラルレッドおよび核酸を染色する DAPI 染色を施して死滅過程を観察した。

(2) 殺藻細菌の産生する殺藻物質の同定

殺藻細菌の産生する殺藻物質の存在
殺藻細菌 A25 株とスケルトネマ・コスタツム NIES-324 株の培養液を、0.4 μm メンブレンインサートを設置した 6 ウェルマイクロプレートの上槽と下槽に接種して培養し、珪藻細胞を経時的に観察した(図 1)。

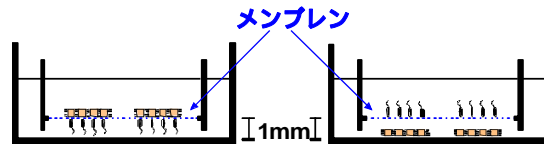


図1 二槽培養実験の模式図

殺藻細菌 A25 株が産生する殺藻物質の局在
グラム陰性の殺藻細菌である A25 株を培養して集菌し、緩衝液中で -80 による凍結と融解を繰り返してスフェロプラスト化し、遠心分離により上澄みと沈殿に分離し、上澄みをペリプラズム画分とした。沈殿を緩衝液に懸濁して超音波破碎して遠心分離し、上澄みを細胞内水溶性画分とした。これらのプロテアーゼ活性はアゾカゼインを基質として測定した。また、各画分をスケルトネマ・コスタツム NIES-324 株培養液に添加し、珪藻細胞を経時的に観察して殺藻活性を判定した。

A25 株が産生する殺藻物質の殺藻活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の影響

殺藻細菌 A25 株のペリプラズム空間抽出液を、セリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ阻害剤である PMSF、Leupeptin およびそれらを組み合わせたものと 30 分間反応させたのち、珪藻スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株の培養液に添加し、経時的に珪藻細胞を観察して殺藻活性を判定した。

(3) 包括固定化による殺藻細菌の活用法の検討

殺藻細菌を包括固定化する担体の材料として食品分野で利用されている増粘多糖類の利用について検討した。カラギーナン、ローカストビーンガム、グルコマンナン及びこれらを混合したゲルに A25 株を包括固定化した担体を作製し、スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株培養液に接種し、NIES-324 株

の細胞密度を毎日顕微鏡観察して計数することにより殺藻効果を判定した。

4. 研究成果

(1) 殺藻細菌による珪藻死滅過程の検討

スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株を改変 SWM- 培地で初期密度 1.0×10^5 cells/ml になるように接種し、25℃、12L:12D の明暗条件で培養し、培養開始 1 日度に対数増殖後期まで培養した殺藻細菌 A25 株を初期密度 1.0×10^4 cells/ml になるように接種してから経時的に一部の培養液を採取して、非染色、ニュートラルレッド染色、DAPI 染色の細胞を光学顕微鏡観察した結果を図 1 に示す。A25 株接種後 48 時間までは NIES-324 株の状態に変化は見られなかったが、66 時間後には半数程度の細胞が収縮し、収縮が見られた細胞ではニュートラルレッドで染色されていないことが確認できた。一方、収縮が見られるが DAPI 染色では青色蛍光が観察される細胞が観察された。70 時間後にはほとんどの細胞が収縮しニュートラルレッド及び DAPI 両方で染色されなくなった。これらの結果から、まず珪藻殻からの細胞膜の剥離が起こり、その時点で珪藻細胞は死に至るが、核 DNA の分解はやや遅れて起こることが示唆された。その際、クロマチンの凝集は観察されず、核 DNA の分解と並行して珪藻細胞内の膜系の破壊が進行し、最終的には殻の内側に細胞内容物が凝集した小さな残渣のみが見られる状態に至った。

高等植物の細胞では、細菌やウイルスに感染すると液胞膜が内部から破られ、様々な分解酵素が細胞内に放出されて細胞が破壊され内容物が凝縮することが知られているが、珪藻細胞でも A25 株の攻撃によって同様のプログラム細胞死が起きていることが示唆された。

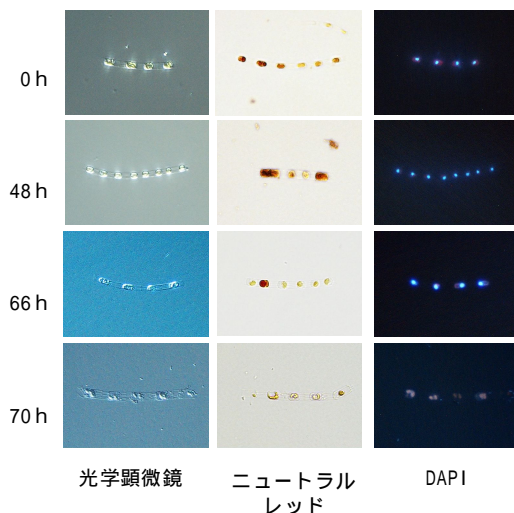


図2 殺藻細菌A25と二者培養したスケルトネマ・コスタツム細胞の経時変化

(2) 殺藻細菌の産生する殺藻物質の同定

殺藻細菌の産生する殺藻物質の存在

図 1 に示した装置での二槽培養実験の結果、珪藻スケルトネマ・コスタツムを上槽、殺藻細菌 A25 株を下槽に接種した試験区で珪藻細胞の死滅が認められ、死滅後も細菌の混入が認められなかったことから、殺藻細菌 A25 株によるスケルトネマの殺藻には直接接触は必要でない、すなわち何らかの物質を介して殺藻が起こることが証明された。

殺藻細菌 A25 株が産生する殺藻物質の局在 殺藻細菌 A25 株のペリプラズム画分をスケルトネマ・コスタツム NIES-324 株培養液に添加した場合、生菌を接種した時と同様に内容物の著しい収縮を伴う死滅が確認されたのに対し、細胞内水溶性画分を添加した場合には、珪藻の死滅は確認されたが内容物の著しい収縮は確認されなかった。また、プロテアーゼ活性は、ペリプラズム画分が 2.3×10^3 unit/mg protein であったのに対し、細胞内水溶性画分では 6.3×10^2 unit/mg protein であった。これらの結果から、殺藻細菌 A25 株のペリプラズム空間に、珪藻殺藻物質が存在することが強く示唆された。

A25 株が産生する殺藻物質の殺藻活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の影響

セリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ阻害剤である PMSF、Leupeptin は A25 株ペリプラズム空間画分の殺藻活性を阻害しなかった。A25 株に近縁な珪藻殺藻シュードアルテロモナス属細菌 A28 株ではセリンプロテアーゼが殺藻に関与していることが示唆されているが、本研究の結果から、A25 株ではプロテアーゼ以外の物質が殺藻に関与している、あるいはプロテアーゼ活性そのものは殺藻に関与しないことが示唆された。今後、殺藻細菌 A25 株の殺藻物質を同定する際には、プロテアーゼ活性ではなく珪藻細胞の収縮を伴う殺藻活性を基準とすることが必要であると考えられた。

(3) 包括固定化による殺藻細菌の活用法の検討

増粘多糖類である κ -カラギーナン、ローカストビーンガム、グルコマンナン及びこれらを混合したゲルに殺藻細菌 A25 株を包括固定化した担体を、スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株培養液 50 ml に接種して殺藻効果を判定した結果、 κ -カラギーナンとローカストビーンガムを混合した担体およびグルコマンナンを用いた担体を接種した試験区で、スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株細胞密度は 2 日以内に減少した。グルコマンナンを用いた場合、作製時に使用する塩の影響で A25 株未固定の担体接種区でも NIES-324 株は減少したが、A25 株固定化担体接種区の方が速やかに珪藻の細胞密度は減少した (図 3)。

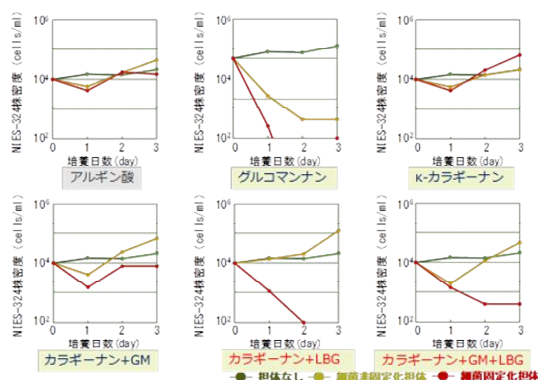


図3 殺藻細菌固定化担体による珪藻細胞密度の経時変化

また、作製した担体を水中モーターフィルターのろ過槽に充填し、形状の変化を観察して耐久性を検討した。-カラギーナン系の担体は、水中モーターフィルター中で2日以内に担体が崩壊したが、グルコマンナン担体は膨潤するが7日は形状が維持された。

これらの結果から、増粘多糖類は止水中では殺藻細菌の殺藻活性を失わせることなくゲル内に細菌を保持することで殺藻細菌を高密度で維持することが可能であると考えられた。しかし、-カラギーナン系ゲルは作製が容易であるが、流水中ではゲル自体が崩壊することで長期間殺藻効果を維持することが困難であり、グルコマンナンは作製時の塩による影響が問題となる。今後は、これらの特性を踏まえて各種ゲル材料の配合率や作製法を検討することで、実用化への展望が開けることが期待される。

(4)今後の展望

本研究により、シュードアルテロモナス属細菌 A25 株による珪藻スケルトネマ・コスタツム NIES-324 株の殺藻機構は、細菌が産生する高分子物質の作用により、珪藻が細胞膜の損傷、DNA の断片化、細胞の収縮というプログラム細胞死様の機構で死滅することが示された。また、本研究ではプログラム細胞死を誘導する物質の特定には至らなかったが、A25 株の細胞表面に近いペリプラズム空間に該当物質が存在することが確認され、殺藻細菌が珪藻に近接することでピンポイントに効果を発揮する可能性が示された。本研究に明らかとなったシュードアルテロモナス属殺藻細菌 A25 株による珪藻殺滅機構の特徴は、広域スペクトルを有する薬剤散布など従来検討されてきた赤潮防除法と比較して安全性の高い手法の開発に結び付くことが期待され、「環境にやさしい」生物的赤潮防除の実現に向けての里標となる発見であると考えられる。

また、平成 29 年度は、殺藻細菌による赤潮原因藻の防除法の実用化に向けた検討を推進した。その成果として包括固定化により

殺藻細菌を現場に高密度で維持できる手法の有効性が示された。これまでに、韓国の研究者によりシュードモナス属殺藻細菌をスポンジ状の構造物に付着させることで殺藻効果を增强するという報告があるが、細菌種によって構造物への付着性が異なることが課題と考えられる。一方、包括固定化は細菌の特性に依存せずに固定化が可能であることから、汎用性の高い手法となることが期待される。今回試行した増粘多糖類は耐久性に課題があることから、今後、複合素材の利用による固定化担体の耐久性の改善を行うことで、実用可能な技術開発に結び付くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

北口博隆・永吉昂輝・益七瀬・藤井啓子・満谷淳、殺藻細菌の包括固定化に用いる多糖類ゲルの検討、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018.3.27、東京海洋大学(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

満谷 淳 (MITSUTANI, Atsushi)
福山大学・生命工学部・教授
研究者番号：80309632

(2)研究分担者

北口 博隆 (KITAGUCHI, Hirotaka)
福山大学・生命工学部・准教授
研究者番号：10320037