

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19148

研究課題名（和文）アスタキサンチン産生海洋細菌と赤潮原因藻の共生による赤潮の新規発生機構の解明

研究課題名（英文）Characterization of a novel bloom-forming mechanism based on interaction between astaxanthin-producing marine bacteria and a bloom-forming alga

研究代表者

植木 尚子（Ueki, Shoko）

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：50622023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：赤潮原因藻ヘテロシグマ(Haka)は強光耐性が高い。申請者らは海洋細菌 *Altererythro bacter ishigakiensis* と Haka の共培養にて非光化学的消光（NPQ）が強化されることを見出した。本研究では、本細菌が産生するとされるアスタキサンチン（Axn）を Haka が利用して、NPQ を強化するという仮定の検証を行った。本細菌中の Axn 量は、他のカロテノイドに比して低く、本細菌を Haka と共培養しても、Haka 中の Axn はほとんど検出されなかった。一方で別の色素が検出されたため、その同定を進めている。また、Haka が細菌貪食にて細菌が生成する特異な化合物を摂取する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の研究計画の全てを遂行できなかったものの、Haka 強光耐性を海洋細菌 *A. ishigakiensis* が強化すること、Haka 強光耐性への本細菌の影響は、Haka の栄養条件により異なることを見出した。一方、当初は本細菌が含有するアスタキサンチン（Axn）が本作用に寄与すると予想していたが、色素分析により別種の色素を検出したため、現在同定をすすめている。本研究は赤潮の原因となる微細藻ヘテロシグマ(Haka)の生態生理について一定の理解をもたらしたといえる。また、本研究の一部として、Haka 発現遺伝子を網羅的に同定し機能予測と共に発表した。この成果は、本研究分野に広く利用され得るものである。

研究成果の概要（英文）：Heterosigma akashiwo occasionally forms bloom near the sea surface. We found out that non-photochemical quenching (NPQ) of *H. akashiwo* was enhanced by co-culturing with a marine bacterium, *Altererythro bacter ishigakiensis*. In this study, we evaluated the possibility that astaxanthin (Axn), which is presumed to be produced and accumulated by the bacterium, is utilized by *H. akashiwo* and enhance the NPQ of the latter. We found that Axn level in the bacterium was rather low, and the compound was not detected in the *H. akashiwo* co-cultured with the bacterium. At the same time, a chemical, presumably peridinin, was detected in the alga in the co-culture. We are currently trying to characterize the chemical in detail. In addition, we found out that *H. akashiwo* phagocytose wide variety of bacteria, potentially uptake various bioactive chemicals synthesized by bacteria.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：赤潮原因藻 細菌貪食 カロテノイド 強光耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

赤潮原因藻ヘテロシグマは、夏季に海面近くで増殖・高密度に集積し、重度の漁業被害を与える『赤潮』を形成する。赤潮が頻発する夏季は、光強度は最高で 2,000 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ と非常に強い。このような強光は多くの光合成生物に有害であり、多くの光合成機構は強光ストレスからの自衛のため、光合成装置の修復機構や、過剰な光エネルギーを散逸する機構を備えている。一方、多くの鞭毛を持つ植物プランクトンの多くは、その移動能力を生かして深い水深に潜り強光を避ける戦略を取るため、光合成系の強光防御機構は陸上植物に比べて遥かに弱い。

しかし、鞭毛藻の一種ヘテロシグマは例外である。本種は著しい強光に晒される海面付近に形成する。遊泳能力を持ちながらも水中深くに潜ることなく、過剰な光があたる海表面で指数関数的に増殖し優占する。つまりヘテロシグマは並外れた強光耐性を備えているが、そのメカニズムには不明な点が多い。

申請者のグループは、ヘテロシグマと付着共生する海洋細菌 *A. ishigakiensis* を見出した。*A. ishigakiensis* は従属栄養性細菌であり、単独では増殖できないが、ヘテロシグマに随伴するとみられ、ヘテロシグマ由来の有機物を利用して増殖する。同時に、ヘテロシグマの増殖は *A. ishigakiensis* に促進される。この時、興味深いことに、本細菌との共培養がヘテロシグマの **NPQ (non-photochemical quenching、過剰な光を熱として放散する葉緑体の強光に対する防御機能)** を増大させることを予備的に見出した。

2. 研究の目的

上述の結果より、申請者らは本細菌がヘテロシグマの強光耐性を増強し、著しい強光下でのヘテロシグマ赤潮形成を可能にするという全く新たな仮説に至った。本研究では、**ヘテロシグマ強光耐性がある種の細菌に補完される可能性を検証**し、その機序を探ることを目的としている。

3. 研究の方法

ヘテロシグマと本細菌を共培養し、ヘテロシグマ単独で培養した場合の増殖速度と NPQ を比較した。さらに、本細菌中のアスタキサンチンがヘテロシグマに取り込まれる可能性を検討するために、本細菌およびヘテロシグマ中の色素分析を行った。また、本細菌よりヘテロシグマへ色素が取り込まれる経路を理解するために、ヘテロシグマが本細菌を貪食する可能性について検討した。

4. 研究成果

①ヘテロシグマと本細菌の共培養によるヘテロシグマ増殖促進能の検討

ヘテロシグマと本細菌を共培養し、ヘテロシグマ単独培養の場合と増殖速度を比較したところ、培養に用いる培地によって、本細菌のヘテロシグマ増殖への影響が異なることが明らかになった。まず、IMK 添加人工海水（塩谷エムエス(株)）を用いた場合、共培養及び単独培養にてヘテロシグマ増殖速度に差は見られなかった。一方で、modified SWM3 培地にて比較した場合には、*A. ishigakiensis* によるヘテロシグマ増殖促進が見られた。IMK は modified SWM3 より多くの微量元素を含み、また、窒素源・リン酸含量も多く、より栄養充足度が高い。つまり、無機栄養成分の充足度が高い場合には、本細菌によるヘテロシグマ増殖促進能が見られないという結果が得られた。

②ヘテロシグマと本細菌の共培養によるヘテロシグマ NPQ が受ける影響の検討

ヘテロシグマと本細菌を共培養し、modified SWM3 培地にて 4 日間維持培養ののち、ヘテロシグマ

NPQ 測定した場合には、ヘテロシグマ単独で測定した場合に比べて NPQ が強化された。一方で、同実験を、IMK 培地を使用して行った場合、NPQ の差は見られなかった。つまり、栄養塩が十二分に充足している状態では、*A. ishigakiensis* の有無による NPQ の変化は見られなかった。一方で、栄養塩が充足しているものの、過剰とは言えない状態では、*A. ishigakiensis* 添加によりヘテロシグマ NPQ が増強されたといえる。

さらに、ヘテロシグマの強光耐性の機序について多角的な情報を得るために、一般には植物プランクトンの NPQ を低下させると言われる栄養制限条件下において、ヘテロシグマの強光耐性の変化を検討した。まず、NPQ を低下させると言われるリン制限条件にてヘテロシグマを培養し、NPQ を測定した。リン制限条件にてヘテロシグマを培養すると、数日後よりヘテロシグマ増殖が見られなくなり、さらに一週間後には死滅する。増殖停止した直後のヘテロシグマ NPQ と栄養十分条件下のヘテロシグマの NPQ を比較したところ、大きな変化は見られなかった。

以上より、ヘテロシグマの NPQ はリン酸の有無、あるいは栄養状態によって大きな影響は受けないものの、栄養がより制限される条件では、*A. ishigakiensis* 添加によりヘテロシグマ NPQ が増強されるという結論を得た。天然海水に含まれる溶存窒素化合物および溶存無機リン酸の濃度は、人工培地に含まれるよりはるかに低い。自然界におけるヘテロシグマの強行耐性が、*A. ishigakiensis* をはじめとする海洋細菌により強化される可能性がある。

③ ヘテロシグマおよび本細菌の色素分析

ヘテロシグマが含有するサンプルに含有される色素を分離分析したところ、葉緑体関連色素としては、クロロフィル C1、C2、フコキサンチン、ビオラキサンチン、ゼアキサンチン、クロロフィル a、βカロテンなどが検出された。*A. ishigakiensis* は、ピンク～赤色を呈する細菌で、この色は、含有されるアスタキサンチンによるとされてきた。しかし、*A. ishigakiensis* が含有する色素を分析したところ、アスタキサンチンは検出されず、ペリグリン様物質が検出された。同様に、*A. ishigakiensis* と共培養したヘテロシグマからもペリグリン様物質が低濃度ながら検出された。現在は、本化合物の同定を進めている。

④ヘテロシグマが *A. ishigakiensis* を貪食する可能性の検討

本研究と並行して行った別のプロジェクトより、ヘテロシグマは、栄養充足状態、リン酸欠乏状態、窒素源欠乏状態など、さまざまな条件下で細菌を貪食することを見出した。そこで、リン酸欠乏状態のヘテロシグマに対する *A. ishigakiensis* の影響を調べるために、リン酸欠乏条件にて 200 cells/mL 程度のヘテロシグマを *A. ishigakiensis* の存在下・非存在下で維持した。すると、*A. ishigakiensis* 非存在下ではヘテロシグマは増殖はせず、10 日前後で死滅するが、*A. ishigakiensis* (OD600 = 1×10^{-2} 相当) を添加すると、 $\sim 6 \times 10^4$ cells/mL 程度まで増殖することが明らかとなった。これは、ヘテロシグマが *A. ishigakiensis* を貪食・消化し、リン酸源として活用していることを示唆する。また、*A. ishigakiensis* が産生する色素がヘテロシグマ強光耐性を強化する可能性について、ヘテロシグマがどのような機構により *A. ishigakiensis* より色素を取り込むのかが不明であったが、本研究により、貪食による取り込みが可能であることが明らかとなった。

⑤その他の成果

本研究では、海洋でヘテロシグマ赤潮が発生した際に、サンプリングし、随伴する細菌叢解析を行うことを計画していた。しかし、研究期間中に、高密度に達するヘテロシグマ赤潮には遭遇しなかった。そこで、将来的にヘテロシグマ生態生理研究に役立てる目的で、ヘテロシグマ transcriptome の整備を並行して

行った。この試みにより、申請者が実験株として利用している H93616 株の transcriptome と、遺伝子予測およびアノテーションを修了し、公開した。NCBI には、すでに 5 つの transcriptome が海外のグループにより公開されているが、2024 年 6 月現在、申請者らによるものが最も網羅的なデータである。また、それらのアノテーションは公開されておらず、申請者らによるものが初めて公開された transcriptome とアノテーションのセットとなる。本成果は、現在進めているヘテロシグマ H93616 株のゲノム配列解読を修了した際に、ゲノム上の遺伝子予測およびアノテーションに利用することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Masanao, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Ueki Shoko	4. 巻 48
2. 論文標題 The dataset of de novo assembly and inferred functional annotation of the transcriptome of <i>Heterosigma akashiwo</i> , a bloom-forming, cosmopolitan raphidophyte	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 109071 ~ 109071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2023.109071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Gajardo Gonzalo, Vergara Karen, Ueki Shoko, Jorquera Milko A et al	4. 巻 143
2. 論文標題 The holobiome of marine harmful algal blooms (HABs): A novel ecosystem-based approach for implementing predictive capabilities and managing decisions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Science and Policy	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envsci.2023.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shoko Ueki
2. 発表標題 Characterization of marine bacteria that support growth of <i>Heterosigma akashiwo</i> under phosphate-limiting conditions
3. 学会等名 International Conferences of Harmful Algae
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐美文子, 小原静香, 隠塚俊満, 近藤健, 中嶋昌紀, 小池一彦, 植木尚子
2. 発表標題 リン欠乏条件下において <i>Heterosigma akashiwo</i> がリン源とするポリリン酸合成細菌の発見.
3. 学会等名 微生物生態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukuyama, S, Ueki, S, et al
2. 発表標題 A marine bacterium promotes the growth of a bloom-forming phytoplankton under phosphorus-depletion
3. 学会等名 第36回 日本微生物生体学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福山 誠也, 宇佐美 文子, 小原 静香, 隠塚 俊光, 近藤 健, 小池 和彦, 植木 尚子
2. 発表標題 リン欠乏状態における海洋細菌による赤潮原因藻の増殖促進機構の解明
3. 学会等名 おかやまバイオアクティブ研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ヘテロシグマトランسكريプトームをNCBI TSAに登録しアノテーションをDryadにて共有した。 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/ICRV01 doi:10.5061/dryad.m0Cfxxpp56</p>
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	隠塚 俊満 (Onduka Toshimitsu) (00371972)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員 (82708)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小池 一彦 (Koike Kazuhiko) (30265722)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	チリ	アントファガスタ大学	ラフロンテラ大学	ロスラゴス大学