

氏 名	まき 牧 てる や 弥
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1252 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Diversity of intracellular bacteria in the bivalve killer dinoflagellate <i>Heterocapsa circularisquama</i> and interrelationships in growths (有害赤潮渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> の細胞内細菌の多様性及び増殖における藻類との相互関係)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 原 紘 之 教 授 内 田 有 恆 助 教 授 今 井 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* は、近年、西日本各地の内湾で赤潮を引き起こし、カキ、アサリ、真珠貝等の二枚貝を大量弊死させることで、水産養殖業に多大な被害を与えている。しかし、本藻の生理生態に関する知見は乏しく、その赤潮発生機構は不明な点が多い。本藻は新種として記載された際に、細胞内に細菌を持っていることが報告されている。単細胞性の藻類細胞の多くは、環境中では細菌と様々な関係を持って生息し、幾つかの細菌類は藻類に栄養物質あるいは生理機能への必須物質を与えることで藻類の増殖を促し、藻類の生態ニッチに影響を与える場合もある。本種のように細胞内に細菌を保有する藻類において、その細菌がはたす役割を明らかにすることは、宿主藻類の生理特性を理解する上で重要である。本研究は、異なる日本の内湾水域から単離された *H. circularisquama* の 5 クローン株、het-Y 株（八代湾）、het-UA 株（浦ノ内湾）、het-A 株（英虞湾）、het-I 株（伊万里湾）、het-UB 株（浦ノ内湾）を用いて、本藻と細胞内細菌の相互関係を培養実験及び分子系統学的解析によって明らかにし、*H. circularisquama* の生理生態を理解しようとするものである。得られた結果は以下のように要約できる。

1) 電子顕微鏡下の観察で *H. circularisquama* の細胞質内及び食胞内に細菌を確認し、本藻の混合栄養性を示した。本藻の培養を DAPI 染色した後、落射蛍光顕微鏡下で観察した結果、*H. circularisquama* は細胞質内に細菌を保持し続けると同時に、細胞外にも細胞内細菌に由来すると考えられる細菌粒子を放出すること確認した。この細胞外細菌は、het-Y 株及び het-UA 株では球菌で、het-A 株、het-I 株及び het-UB 株では桿菌であった。

2) *H. circularisquama* 5 株の培養中における細胞内細菌数と総細胞数の経時的変動を比較した結果、細胞内由来の細菌群において細菌数の増加は本藻の増殖によって大きく影響を受け、細菌数の増減パターンによって細菌群は 3 グループに分けられることを明らかにした。すなわち、藻類が死滅すると増殖も生存も不可能になる細菌群（het-Y 株、het-UA 株由来）、細胞数を維持するが増殖が不可能になる細菌群（het-A 株、het-I 株由来）、死んだ藻類細胞を利用して増殖できる細菌群（het-UB 株由来）であった。またこの het-UB 株由来細菌群は細菌用培地でも増殖した。このように、細胞内細菌の増殖・生存における *H. circularisquama* 生細胞への依存程度は、偏性的なものから通性的なものまで幅があることを見いだした。

3) *H. circularisquama* の無菌化を試み、het-UB 株で細胞質内に細菌を持たない無菌株の確立に成功し、種々の光強度条件下、栄養塩及び塩分濃度を低下させた培地中で、無菌株と有菌株の増殖を比較した。*H. circularisquama* は、細胞質内に細菌を有することで、栄養分を浪費するものの、低塩分への耐性を得ること、ならびに遊泳能力が向上することを明らかにした。

4) 細胞内細菌の 16SrDNA を系統分類学的解析に供したところ、本藻 5 株の細胞内細菌群は、多くの共生細菌が属する γ -proteobacteria 群 (bac-G)、ならびに殺藻細菌群が属する *Flexibacter*-*Cytophaga*-*Bacteroides* グループ (bac-F) に属する新奇の細菌 2 種に分類同定された。FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によって bac-G は全 5 株の藻細

胞において核内に、bac-Fはhet-A株、het-I株及びhet-UB株の藻細胞の細胞質内に存在することを明らかにした。

以上のように、*H. circularisquama*の細胞内細菌は新奇の細菌2種より構成され、核内と細胞質内に存在すること、細菌が本藻に対する依存度にも偏性的なものから通性的なものまで幅の有ることを明らかにした。さらに細胞質内に存在する細菌は本藻の遊泳能力向上と、低塩分への耐性の強化に寄与し、日周鉛直移動能の強化、及び内湾への河川水流入に伴う低塩分条件下での生残に貢献していると推測した。

論文審査の結果の要旨

有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の赤潮は、養殖ガキ、アサリ及び真珠貝等の二枚貝を大量に斃死させることで、深刻な社会問題を引き起こしている。本藻の生理生態に関する知見は限られており、現在、その赤潮発生機構はまだ解明されていない。本藻の細胞内には細菌が存在しており、藻類に与える細菌の影響は、藻類の生理生態及び赤潮の発生機構を理解する上で重要と注目されている。本論文は、異なる日本の内湾から単離された *H. circularisquama* の5クローン株を用いて、本藻と細胞内細菌の相互関係及び細胞内細菌の多様性を明らかにしたもので、評価すべき主な点は以下の通りである。

1) *H. circularisquama* 5株の培養実験において、細胞内細菌数と総細胞数の経時的変動を比較した結果、細菌数の増減パターンにより、本藻が死滅すると増殖も生存も不可能になる細菌群、細胞数を維持するが増殖が不可能になる細菌群、死んだ藻類細胞を利用して増殖できる細菌群の3グループに分けられた。このように、細胞内細菌の増殖・生存における *H. circularisquama* 生細胞への依存程度は、偏性的なものから通性的なものまで幅のあることを見いだした。

2) *H. circularisquama* の無菌株（細胞質に細菌を持たない）の確立に1株で成功した。この無菌株と有菌株の増殖を、種々の光強度条件下、栄養塩及び塩分濃度を低下させた培地中で比較した結果、細胞内細菌によって栄養分が浪費されるものの、低塩分への耐性が高まることを明らかにした。また、細胞内細菌は本藻の遊泳能力向上にも貢献することを示した。

3) 細胞内細菌の16SrDNAを用いた系統分類解析によって、本藻5株の細胞内細菌群が γ -proteobacteria 群 (bac-G) と *Flexibacter*-*Cytophaga*-*Bacteroides* グループ (bac-F) に属する新奇の細菌2種で構成されていることを明らかにした。

4) FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法によって bac-G は全5株の藻細胞において核内に、bac-F は3株の藻細胞の細胞質内に存在することを示した。また、この細菌の種構成を形態的及び生理的特徴と比較することで、細菌種が同じであっても細胞内細菌の性質や形態は株間で異なることを明らかにした。

以上のように本研究は、水産養殖業に被害を与える有害渦鞭毛藻 *H. circularisquama* と共生細菌の相互関係を明らかにし、本藻の生理生態の理解を深めると共に、細胞内共生細菌類の多様性を示したものであり、微生物生態学、海洋環境微生物学、及び海洋分子微生物学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月18日、論文並びにそれに関した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。