

Notice on Plankton Seminar

#10005

9:30-11:30, 7 Jun. (Mon) 2010 at Room #N407

Nakashima, T., Y. Miyazaki, Y. Matsuyama, W. Muraoka, K. Yamaguchi and T. Oda (2006)

Producing mechanism of an algicidal compound

against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium

Appl. Microbiol. Biotechnol. **73**: 684-690.

赤潮微細藻類に対しての γ -プロテオバクテリアに属する海洋細菌の殺藻物質の生成メカニズム

有害有毒藻類ブルーム (HABs) は、海洋生物を大量死させることで知られ、世界中の沿岸域において近年発生が頻繁になったと言われている。HABs の制御が強く期待され、殺藻細菌が期待されている。その中で、殺藻物質を生成する間接攻撃型の殺藻細菌は、HABs の制御に有効と考えられるが、その生成メカニズムの知見は乏しい。本研究は、大村湾から単離した γ -プロテオバクテリアに属する MS-02-063 株を用い、殺藻物質プロギジオシン様色素 (PG-L-1) の生成メカニズムが、クオラムセンシングによるのか否かを解明することを目的とした。

MS-02-063 株は YPG 培地 (50% 人工海水中に、酵母抽出物 12.5 g, ペプトン 12.5 g, グルコース 30 g を含有) にて温度 28°C で培養し、総細菌数は DAPI 染色法で、細菌量は 10 ml 中の MS-02-063 株培養の乾重量で求めた。赤潮藻 *Heterosigma akashiwo*, *Heterocapsa circularisquama*, *Gymnodinium impudicum* は土壌抽出液入りの ESM 培地にて、明暗周期 12L: 12D、光強度 30 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 、温度 26°C で培養し、*Alexandrium tamarense* は改変 SWM-3 培地にて同じ光条件、温度 19°C の環境下で培養した。MS-02-063 株の PG-L-1 生成率は 536 nm の吸光度で測定し、前報で確定した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定で色素が PG-L-1 であることを確かめた。MS-02-063 株を様々な温度、pH、塩分で培養し、増殖好適環境を調べた。PG-L-1 (10 mg mL^{-1}) を ESM 培地で 50 倍に希釈し、その後 2 倍希釈シリーズを調整した。 2×10^4 cells/mL の藻類培養 (500 μ L) に各希釈の PG-L-1 を同量添加し二者培養を 24 時間行い、生残した藻類細胞を計数した。また、*H. akashiwo* 培養 (2×10^4 cells mL^{-1}) に、 2×10^3 - 10^7 cells/mL になるよう種々に希釈した MS-02-063 株培養を加え、抗生物質エリスロマイシンを添加した場合 (10 μ g mL^{-1}) と無添加の場合で殺藻能を比べた。最後に、クオラムセンシングと MS-02-063 株の色素生成メカニズムの関係を調べるために、エリスロマイシンを含む YPG 寒天培地 (細菌の増殖は阻害しないが、色素の生成を阻害する) に MS-02-063 株を接種し、ホモセリンラクトンを三段階の濃度で (2 mM, 1 mM, 0.5 mM) で寒天培地に 5 μ L ずつ滴下した。また、YPG 寒天培地に MS-02-063 株を接種し、クオラムセンシングのひとつである Autoinducer 活性の阻害物質であるホモセリンラクトンと複合体を生成する β -シクロデクストリンを染み込ませたペーパーディスクを置くことで、最近に由来する色素の阻止円の直径を測定し、阻害活性を評価した。

MS-02-063 株の増殖と色素生成は 28°C、pH 8 で最も高く、これは MS-02-063 株を単離した大村湾の環境条件と一致した。二者培養により、殺藻能は MS-02-063 株の細胞濃度に依存することが分かった。エリスロマイシンを添加した培地で二者培養すると、色素は生成されず、どの細菌添加密度でも *H. akashiwo* は殺藻されなかった。本研究の結果、MS-02-063 株の色素生成はホモセリンラクトンの関係するクオラムセンシングによって誘導され、Autoinducer 活性を阻害する β -シクロデクストリンによって阻害されることが示唆され、MS-02-063 株の殺藻能はクオラムセンシングによるものと考えられた。本株は大量の多糖を生産することから、粒子に付着し、バイオフィーム中に微生物群集を形成すると思われる。本株や他の色素生産細菌は、自然環境でもバイオフィームの中でクオラムセンシングを通じて細胞間コミュニケーションを行い、色素生産を行っている可能性があり、HABs の制御に貢献している可能性がある。

大西 由花