

Notice on Plankton Seminar

#12002

9:30-12:00, 7 Mar. (Mon.) 2012

at Seminar room in Hakodate Industry-Academic-Government Cooperation Center

Carsten Paul and Georg Pohnert (2011)

Interactions of the Algicidal Bacterium *Kordia algicida* with Diatoms

: Regulated Protease Excretion for Specific Algal Lysis

PloS one. 6 (6): e21032.

殺藻細菌 *Kordia algicida* と珪藻の相互作用: 藻類を特異的に溶藻するプロテアーゼの分泌調節

海洋や淡水の生態系において、珪藻は一次生産者として重要な役割を持つ。微細藻類の増殖は光や温度などの非生物的要因や、動物プランクトンによる捕食や他の藻類種とのアレロパシー、細菌などの生物的要因に左右される。特に細菌に関しては、近年 Harmful Algal Bloom (HAB) の生物学的防除を目的として HAB を形成する藻類種と殺藻細菌との相互作用に関する研究が行われてきた。しかし、珪藻のような非 HAB 形成種と殺藻細菌に関しては知見が少なく、藻類の殺藻物質の産生機構についても一部の例外を除きほとんど未解明である。細菌が酵素などの物質を産生する仕組みとして、細菌から分泌される低分子化合物を細菌が感知することで互いの密度を把握し、細菌の密度が高くなると抗生物質や酵素などを合成する”クオラムセンシング”と呼ばれる機構があり、殺藻物質の産生もクオラムセンシングによって調節されていると考えられている。本研究は、殺藻細菌 *Kordia algicida* の珪藻 *Skeletonema costatum* との相互作用を詳細に理解するため、ろ液の殺藻能や殺藻物質の特定を行い、そして殺藻物質の産生を調節する要因を調べた。

実験に用いた *Kordia algicida* OT-1 株は Zobell 培地にて 15°C、90-100 rpm で振とう培養した。藻類は *S. costatum*、*Thalassiosira weissflogii*、*Phaeodactylum tricorutum*、*Chaetoceros didymus* のいずれも有菌株を用い、明暗周期 14 hL: 10 hD、光強度 40- 45 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、温度 15°C で維持培養を行った。まず、対数増殖期に達した OT-1 株を人工海水(ASW)と Zobell 培地を 10: 1 で混合した培地に接種し培養した。細菌密度は波長 550 nm における Optical Density (OD: 光学密度) を測定し、OD が 0.32 以上に達したとき、50 mL の ASW へそれぞれ 1 mL ずつ添加した。24 時間培養後、孔径 0.22 μm のフィルターで細菌を除去し、ろ液を作成した。ろ液を上述した 4 種の藻類へそれぞれ添加し、殺藻能を確認した。また、ろ液を Amicon Ultra centrifugal filter units を用いて 30 kDa より高分子の画分とそれより小さい低分子の画分にサイズ分画し、それらの *S. costatum* に対する殺藻能を確認した。次に、殺藻物質がプロテアーゼであるかどうかを検討する実験を行った。OT-1 株の培養を孔径 0.22 μm のフィルターでろ過後、PMSF(セリンプロテアーゼ抑制物質)を添加し 24 時間インキュベートした。その後、ろ液の *S. costatum* に対する殺藻能を確認した。さらに、OT-1 株の増殖におけるプロテアーゼ分泌の変化を追うため、蛍光色素 (BODIPY FL) を用い、その蛍光値から OT-1 株の増殖時のプロテアーゼ分泌速度 (PRR) を求めた。また、実験開始時及び 16 時間後に高分子画分を除いた OT-1 株のろ液を添加する実験区を設け、同様に PRR の変動を調べた。

OT-1 株のろ液はそれぞれ *C. didymus* を除く 3 種の藻類に殺藻活性を示した。また、分画前のろ液と >30 kDa 画分に殺藻作用が確認されたこと、これらの画分の殺藻活性が熱を加えると失活することから、殺藻物質が熱に弱い >30 kDa の高分子の物質であることが考えられた。さらに、OT-1 株のろ液に PMSF を添加すると殺藻活性が失われたため、この殺藻物質がプロテアーゼであることが推察された。OT-1 株の増殖におけるプロテアーゼ分泌は、44 時間後から始まり、OT-1 株低分子画分を添加した実験区では、添加直後からプロテアーゼの分泌が促進されていた。本実験結果より、OT-1 株低分子画分に細菌の密度を感知する物質が含まれていることが推察され、このプロテアーゼの分泌をクオラムセンシングが調節している可能性が示された。

黒田 麻美