

Notice on Plankton Seminar

#13005

9:30-12:00, 3 June (Mon.) 2013 at room # N602

\*\*\*\*\*

Mayali, X., J.S.P. Franks, Y. Tanaka and F. Azam (2008)

Bacteria-induced motility reduction in *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae)

*J. Phycol.* **44**: 923–928.

渦鞭毛藻 *Lingulodinium polyedrum* の運動性を阻害する細菌

水産業や公衆衛生を脅かす有害有毒渦鞭毛藻のブルームは、沿岸域における深刻な環境問題のひとつであり、近年、世界中で発生頻度と強度を増している。渦鞭毛藻 *Lingulodinium polyedrum* は暖温帯域から熱帯域のあまり富栄養化していない海域で出現が確認されている赤潮形成種である。著者らは、過去に本種の増殖および鞭毛による運動を阻害し、テンポラリーシストの形成を促す細菌 ALG1 株、LPK5 株および LPK13 株を単離した。それらは何らかの物質を生成して藻類を攻撃する細菌だと推測された。本研究では、その物質の特定に繋がる知見を得ることを目的として、藻類の遊泳行動を観察する新たな手法を用いて実験を進めて行くこととした。

*L. polyedrum* CCMP 1932 無菌株は、f/4 培地を用いて、18°C、16h L: 8h D、160  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の環境で培養した。細菌 3 株は ZoBell 2216 培地で培養し、終濃度  $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  になるよう藻類培養に添加した。細菌の作用により藻類が遊泳を阻害され、沈降した後に、培養を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (acrodisc HT Tuffryn filter) で濾過し、藻類細胞と細菌を取り除いた。ここで得た濾液を、限外ろ過膜を用いて、含まれる蛋白質の分子量が 50 kDa を超えるものとそうでないものに分けて藻類細胞に添加した。細菌株の阻害効果は、ビデオレコーダーで撮影した軌道を fast, slow, sinking の 3 つに分けて計数することで把握した。その結果、細菌 ALG1 株および LPK5 株の 50 kDa 以上の物質が溶解した濾液は、藻類の運動性阻害作用を持っていた。また、細菌 LPK13 株の濾液添加区は、50 kDa 以上でも以下でも運動性阻害作用を持っていた。次に、限外ろ過膜で濾過をした細菌 LPK13 株の濾液に 80°C・10 分間の熱処理を加えて細菌の放出した殺藻物質 (タンパク質) を変性させた。それらを *L. polyedrum* 培養に添加した結果、50 kDa 以上の濾液添加区で運動性阻害が生じなかったことから、この細菌株は 2 種の物質を生成していること、および運動性阻害酵素は 50 kDa 以上の区分の濾液に含まれることが分かった。3 つめの実験として、限外ろ過膜で濾過をした濾液に、システインプロテアーゼ (E64)、セリンプロテアーゼ (PMSF) および Pefabloc (PEFA) を、プロテアーゼ阻害剤としてそれぞれ個別に添加し、*L. polyedrum* 培養に加えた。その結果、LPK5 株・50 kDa 以上の濾液に PEFA および E64 を添加したとき、運動性阻害が生じなかったことから、この細菌株が生成する物質はセリンプロテアーゼである可能性が考えられた。さらに、細菌の放出する物質が、レクチン、セリン、トレオニンおよびグリシンのいずれかであることを確かめる実験を行った。細菌 ALG1 株を添加し藻類の運動性を阻害させた濾液と、*L. polyedrum* 培養の濾液 (コントロール区) に、蛋白質分解酵素を検出するための蛍光物質として、上記の酵素に反応する 4 種の 7-amido-4-methylcoumarin (AMC) を添加し、蛍光値を測定した。すると、いずれの AMC 添加区でもコントロール区との間に明確な差は見られなかったことから、上記 4 種の物質ではないことが明らかとなった。最後に、*L. polyedrum* 培養に精製したセリンプロテアーゼであるプロナーゼ E を、1.8, 9, 36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  になるよう添加し、プロナーゼ非添加区と藻類細胞の様子を比較した。このとき、ビデオレコーダーで撮影した映像を元に藻類細胞の遊泳速度を算出した。その結果、プロナーゼの密度に依存して藻類の運動性が阻害された。

本研究は、細菌 3 株の生成する運動性阻害酵素を推定し、その実験の過程で、渦鞭毛藻の運動性が藻類細胞の状態を示す指標になることを明らかにした。今後は、渦鞭毛藻が運動性を阻害される細胞内外の要因を解明することが必要である。

大西 由花