

Paul, C. and G. Pohnert (2013)
Induction of protease release of the resistant diatom *Chaetoceros didymus*
in response to lytic enzymes from an algicidal bacterium
PLOS ONE 8: e57577. doi: 10.1371.

殺藻細菌 *Kordia algicida* が産生する細胞溶解性酵素に反応して
珪藻 *Chaetoceros didymus* はタンパク質分解酵素を産生し対抗する

Kordia algicida は細胞溶解性のプロテアーゼを産生することによって植物プランクトンの細胞を溶解し、殺藻する海洋殺藻細菌である。過去の研究より、*K. algicida* は *Skeletonema costatum* を含む複数種の珪藻に対して殺藻性を示すが、*Chaetoceros didymus* は *K. algicida* の影響を受けないと報じられている。本研究では、*K. algicida* 由来のプロテアーゼに対する *C. didymus* の耐性に関する機構を明らかにし、その機構に関する物質について検討した。

実験は *K. algicida* の培養濾過液 (以下濾液) を植物プランクトンの培養に加え、殺藻細菌のプロテアーゼに対する植物プランクトンの耐性を検討した。また、プロテアーゼ活性の測定には、蛍光色素によるプロテアーゼ活性アッセイを用いた。*S. costatum* RCC75 株及び *C. didymus* CH5 株の培養 0.375 mL 中に *K. algicida* OT-1 株の濾液 1.125 mL を加え、温度 15°C、明暗周期 14 hL:10 hD、光強度 40-45 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で培養し、蛍光値により植物プランクトンの増減を測定した。また、各実験区から分取した副試料 10 μL に蛍光色素 BODIPY FL で標識したカゼインを加え、発生した蛍光値を測定することにより培養液中のプロテアーゼ活性を測定した。培養実験の結果、*S. costatum* では殺藻がみられたが *C. didymus* は殺藻されなかった。また、プロテアーゼ活性アッセイの結果、*C. didymus* に *K. algicida* の濾液を加えた実験区では、培養液中のプロテアーゼ活性の増加が認められた。以上のことから、*C. didymus* は濾液中の *K. algicida* 由来の物質に反応し、プロテアーゼを産生することが示された。

次に *C. didymus* が産生するプロテアーゼの性状及び、*C. didymus* のプロテアーゼ産生を誘導する *K. algicida* 由来の物質を特定するために、*C. didymus* に *K. algicida* 濾液を加えた実験培養を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。この実験培養を上記の条件で 3 日間行い、0.2 μm の滅菌フィルターで濾過し、アミコン遠心フィルターで遠心濃縮を行い、分子量 30 kDa 以下のタンパク質を除去した。遠心濃縮したタンパク質を電気泳動に供した後、ゲルに含まれるプロテアーゼを染色し、試料中のプロテアーゼの分子量を特定した。また、*K. algicida* の濾液を 80°C で 10 分間熱処理をして失活させたもの、及び *K. algicida* 濾液中の物質を遠心フィルターで 30 kDa を境目の分子量に分画して *C. didymus* に加え、同様の実験を行った。その結果、*C. didymus* と *K. algicida* の濾液の共培養中には *C. didymus* が産生したと考えられる分子量 85, 70 及び 35 kDa のプロテアーゼが検出された。また、*K. algicida* の濾液を熱処理で失活させた実験区、及び分子量 30 kDa 以下の物質を加えた実験区では *C. didymus* のプロテアーゼは産生されなかった。

C. didymus の産生するプロテアーゼが *K. algicida* の殺藻性を不活性化させる能力を検討するために、*C. didymus* の *K. algicida* の濾液との共培養液を *S. costatum* の培養に加えた。*K. algicida* の濾液 30 mL に対数増殖期の *C. didymus* 培養 10 mL を添加して 3 日間培養後、0.2 μm の滅菌フィルターで濾過し、その濾液 1.125 mL に *S. costatum* の培養 0.375 mL を加え、上記の条件で培養した。培養期間中の蛍光値により *S. costatum* の増減を測定した。実験の結果、*C. didymus* を *K. algicida* 濾液と共培養した濾液を添加した実験区で *S. costatum* の殺藻が見られた。

本研究により、*C. didymus* は *K. algicida* に対して耐性を持ち、*K. algicida* 由来の熱変性する分子量 30 kDa 以上の物質に反応して、分子量 85, 70 及び 35 kDa のプロテアーゼを産生することが示された。このことから、*C. didymus* は *K. algicida* のプロテアーゼに対抗するプロテアーゼを産生し、耐性を持つことが示唆された。*K. algicida* の濾液と *C. didymus* を共培養し、無菌濾過したものを *S. costatum* と共培養すると *S. costatum* の殺藻が見られた。*C. didymus* 由来のプロテアーゼが *K. algicida* の殺藻物質 (プロテアーゼ) に与える影響は不明であり、今後の研究が必要である。

児玉敢