

Li, Y., H. Zhu, X. Lei, H. Zhang, G. Cai, Z. Chen, L. Fu, H. Xu and T. Zheng (2015)
The death mechanism of the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* induced by
algicidal bacterium *Deinococcus* sp. Y35
Front Microbiol. 6: 992. doi: 10.3389/fmicb.2015.00992

殺藻細菌 *Deinococcus* sp. Y35 株による
有害有毒藻類ブルーム形成種 *Alexandrium tamarense* の殺滅機構

近年、沿岸域において有害有毒藻類ブルーム (HABs) の発生頻度が高くなり、沿岸環境や海洋生物に対しての甚大な被害が報告されている。特に HABs 形成種である渦鞭毛藻類 *Alexandrium tamarense* は、二枚貝等の毒化を引き起こす事を通じて経済面や人体に影響を与えている。これまで HABs の防除方法として粘土散布等の激しい対策がとられているが、現在は環境にやさしい対策として HABs 形成種に対して殺藻能を持つ細菌を用いた手法が考えられている。本研究では、殺藻物質を産生する細菌 *Deinococcus* sp. Y35 株が、*A. tamarense* を殺滅するメカニズムを検討した。

実験は *Deinococcus* sp. Y35 株と無菌の *A. tamarense* を共培養し、*A. tamarense* がストレス環境下において過剰産生する活性酸素種 (ROS) の量の変動、それに伴う細胞膜の統合性、細胞内のタンパク質量や細胞小器官への影響を検討した。実験に供した Y35 株は、LB 培地で温度 28 °C、120 rpm の回転振盪で 24 時間培養し、*A. tamarense* は海水 f/2 培地で温度 20 ± 1 °C、明暗周期 12 hL:12 hD、光強度 50 μmol photons m⁻² s⁻¹ で培養した。各実験において、Y35 株が *A. tamarense* 株の培養に対して 0.5、1.0、2.0 及び 3.0% になるように添加した後、最長 48 時間共培養したものを実験に供した。まず Y35 株の殺藻能を検討するために、培養期間中の *A. tamarense* の増減を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。また、各培養試料から副試料 0.5 mL を分取し、ROS を感知して蛍光する DCFH-DA を 0.5 mL 添加し (終濃度 10 mM)、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光値を測定し、藻体内の ROS 量を算出した。次に Y35 株が、藻体内のタンパク質量、過酸化脂質量、及び抗酸化酵素活性に与える影響を検討した。*A. tamarense* の培養に対して Y35 株の添加割合が 1.0 及び 2.0% の共培養を遠心濃縮した後、超音波によって細胞を破壊した。その後試料を Coomassie Brilliant Blue で染色した後、測定キットを用いてタンパク質量を算出した。また、過酸化脂質の副産物であるマロンジアルデヒド (MDA) 量と、抗酸化酵素である SOD, CAT 及び POD の活性を測定することにより、過酸化脂質量と抗酸化酵素活性量を算出した。

次に Y35 株が *A. tamarense* 内の葉緑体に与える影響を、光合成色素量と光化学系 (PS) II における光化学反応の活性から検討した。実験は、共培養を遠心濃縮した後、分光光度計による吸光度から光合成色素のクロロフィル *a* 及びカロテノイドの含量を導出した。またパルス変調クロロフィル蛍光から PS II での反応効率を算出し、PS II における相対電子伝達率 (rETR) を導出した。同時に qE クエンチング (NPQ) における反応強度も測定した。PS II の反応効率と rETR の測定において、PS II の阻害剤である DCMU を添加した実験区をポジティブコントロールとした。最後に、Y35 株が藻体の核に与える影響を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると同時に、遺伝子発現量を測定した。

実験の結果、*A. tamarense* に対して Y35 株が 1.0% 以上添加の実験区で殺藻が見られた。ROS 量は、実験区で増加した後に減少したが、培養期間中 Y35 株が 1.0% 以上添加の実験区では、コントロール区よりも高い数値となった。藻体内のタンパク質量は、実験区でコントロール区より減少した。また、実験区の抗酸化酵素の SOD, CAT, POD の活性量及び MDA は増加した。光合成色素量は、Y35 株が 1.0% 以上の実験区で減少傾向が見られ、また葉緑体の形態変化や膜の破損が観察された。また、同実験区で PS II の反応効率及び rETR は減少したが、NPQ は増加していた。光合成に関与する遺伝子である *psbA* 及び *psdD* の *A. tamarense* の発現量は、培養 6 時間で Y35 株を 1.0% 添加の実験区において増加し、2.0% の実験区で減少したが、培養 24 時間後には 1.0% の実験区で減少し、2.0% の実験区で増加した。*rbcL* 遺伝子の発現量は両実験区で低い値となった。PCNA の発現量は培養 6 時間で両実験区共に増加し、培養 24 時間後には減少した。また検鏡観察の結果、実験区の細胞は核膜や核中の物質の破損が認められた。

本研究により、*Deinococcus* sp. Y35 株は *A. tamarense* の増殖や光合成を阻害することが示された。また本菌による殺滅機構として、ROS 産生量や抗酸化酵素活性量を上昇させ、細胞膜や核、光合成色素を破壊し、光合成効率を低下させ、光合成関与遺伝子の発現に悪影響を与えることが明らかとなった。

児玉 敢

次回のゼミ (9 月 20 日 (月) 9:30~, N204 にて) は、引地さん、前角地さんの予定です。