

殺藻細菌の殺藻機構におけるクオラムセンシング機構の検証 (仮題)
(卒業論文中間発表)

【研究背景と目的】

赤潮とは水中の微小生物, 特に植物プランクトンの大量増殖や集積の結果, 発生する海水の着色現象のことである。とりわけ有害有毒藻類の赤潮は, 海洋生物の斃死や毒化, それに伴う深刻な漁業被害をもたらしている。従来の有効な赤潮対策としては粘土散布などが挙げられるが, 高いコスト及び環境への悪影響が懸念されている。そこで近年では環境に配慮された対策として, 現場海域のアマモ場や藻場に高密度で分布する殺藻細菌を用いた防除が提案されている。殺藻細菌とは, 植物プランクトンを攻撃・殺滅することにより有機物を利用して増殖する細菌のことである。赤潮の防除対策として活用するためには殺滅機構の把握が基本的に重要である。しかしながら, 十分に解明されていないのが現状である。

そこで本研究では, 殺藻細菌の殺滅機構の解明のため, 細菌の環境応答, 認識, 情報伝達機構の一つである, クオラムセンシング (Quorum Sensing: QS) 機構に着目した。QS 機構とは, 細菌がある一定以上の密度にまで到達したことを, 細菌自身が産生する情報伝達物質 (オートインデューサー) を指標として感知し, 特定の遺伝子発現を制御する機構である。殺藻細菌の殺滅機構においても QS 機構が関与していることがこれまでに示唆されている。そこで本研究では, 細菌の情報伝達機構の一つである, オートインデューサー1 (アシルホモセリンラクトン) が仲介するタイプの QS の 阻害物質である β シクロデキストリン (β -Cyclodextrin: β -CD) を用いて, 殺藻細菌の殺滅機構において QS 機構が関与しているか否かを検証した。

【材料と方法】

まず QS 機構のオートインデューサー1 の阻害物質 β -CD が, 実験対象の植物プランクトン及び殺藻細菌株の増殖に影響を及ぼすか否かの培養実験を行った。実験には *Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo* 893株, *Karenia mikimotoi* の3種類の赤潮原因藻類の無菌培養株を用いた。また, 殺藻細菌及び増殖阻害細菌株については, Inaba (2016) より *C. antiqua* を対象とする19株, *H. akashiwo* を対象とする5株, *K. mikimotoi* を対象とする1株の計25株を選抜し用いた。赤潮藻類は, 光強度 50-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14 h D: 10 h D, 培養温度は *H. akashiwo* で 20°C, *C. antiqua* 及び *K. mikimotoi* で 25°C とした。

β -CD に対する植物プランクトンの耐性実験は, 滅菌した β -CD を植物プランクトンの培養に添加することで行った。まず *C. antiqua* と *K. mikimotoi* では最終的な細胞密度を $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ のオーダーに, *H. akashiwo* は $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ のオーダーになるように, 良好に増殖した培養を改変 SWM-3 培地で希釈し, 試験管に接種した。その後藻類が接種されている試験管に, β -CD を終濃度がそれぞれ 1.0, 10, 100 μM になるように, 添加し, 実験区を設定した。各実験区は4本

立てとした。このとき改変 SWM-3 培地のみを添加した実験区を設け (β -CD 無添加), コントロールとした。各実験区の試験管を上記の藻類培養条件下で培養し, 3 日毎に蛍光光度計 (Turner Designs 10-AU Fluorometer) で蛍光値を測定することで, 藻類の増減を追跡した。

β -CD に対する細菌株の耐性実験は, ペーパーディスク法を用いて行った。まず ST10¹ 液体培地に細菌株を摂取し, 最高密度になるまで暗所にて室温 (20°C) で 3-5 日間培養した。その培養を ST10¹ 寒天平板培地に 0.1 mL ずつ塗抹した。各細菌株を塗抹した寒天培地上に滅菌ペーパーディスク (直径 8 mm) を 5 枚静置し, それぞれのペーパーディスク上に 1, 1.0, 3.0, 10, 30, 100 μ M の濃度の β -CD 溶液を添加した。1 細菌株につき 1 枚のシャーレを用意し, 上記の培養条件下で二週間培養の後に, ペーパーディスクの周辺に細菌のコロニー形成が阻止されている阻止円が形成されているか否かを判別した。

【結果】

1. β -CD に対する植物プランクトンの耐性実験

C. antiqua のコントロール区 (β -CD 非添加区) における蛍光値は, 実験開始時の 13 から増加し, 9 日目に最大値 45 を記録した後に減少した。 β -CD 濃度が 1.0 μ M 添加区では 15-42, 10 μ M 添加区では 13-32, そして 100 μ M 添加区では 12-29 の間で推移した。*H. akashiwo* では, コントロール区の蛍光値は 20-185 の間で推移した。 β -CD 濃度が 1.0 μ M 添加区では 21-166, 10 μ M 添加区では 19-169, そして 100 μ M 添加区では 16-148 の間で推移した。*K. mikimotoi* では, コントロール区の蛍光値は 9-21 の間で推移した。 β -CD 濃度が 1.0 μ M 添加区では 9-21, 10 μ M 添加区では 7-17, そして 100 μ M 添加区では 7-15 の間で推移していた。以上から実験に用いた濃度範囲では, β -CD が三種の赤潮藻類に影響を与えていないと考えられた。

2. β -CD に対する細菌株の耐性実験

細菌 25 株は, いずれもシャーレ一面にコロニーを形成した。また, β -CD 濃度が 100 μ M 実験区のペーパーディスク周辺にもコロニーの形成が確認され, 阻止円は観察されなかった。以上から β -CD は用いた細菌に影響を与えないと判断した。

【今後の予定】

現在 *C. antiqua* とそれを対象とする殺藻細菌 19 株との二者培養実験を行い, 殺滅機構における QS 機構の存在を検討中である。今後は, 他の藻種についても二者培養実験を行っていく予定である。また, 得られる結果から, 殺藻細菌の殺滅機構における QS 機構 (今回はオートインデューサー 1 のタイプ) の関与を考察していく予定である。

児玉 敢