

殺藻細菌におけるクオラムセンシングを介した殺藻に関する研究 (仮題)  
(卒業論文発表練習)

【研究背景と目的】

我が国の沿岸域においては高度経済成長期より有害有毒藻類の赤潮が頻繁に発生するようになり、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。従来の赤潮対策として粘土散布等が挙げられるが、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、藻類を攻撃・殺滅することにより有機物を得て増殖する殺藻細菌を用いた防除方法が提案されている。殺藻細菌は現場海域のアマモ場や藻場に高密度で分布することが知られるようになったが、赤潮防除方法として殺藻細菌を利用するには、殺藻機構の把握が重要であるにも関わらず、十分に解明されていないのが現状である。これまでに、殺藻細菌の殺藻機構においてクオラムセンシング (Quorum Sensing: QS) 機構の関与が示唆されている。QS 機構とは、細菌がある一定密度以上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 (Autoinducer: AI) 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。AI は複数種存在することが報告されており、本研究では、AI の一つである AI-1 (別名 AHL: アシルホモセリンラクトン) が仲介するタイプの QS に着目した。AI-1 が仲介する QS 機構を阻害する  $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -Cyclodextrin:  $\beta$ -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、AI-1 を介する QS 機構の阻害物質  $\beta$ -CD が、実験対象の藻類及び殺藻細菌株の増殖に影響を及ぼすか否かについて検討する培養実験を行った。対象とした赤潮原因藻類は *Heterosigma akashiwo* 893 株, *Karenia mikimotoi* G303 株, *Chattonella antiqua* NIES-1 株の無菌培養 3 株を実験に供した。藻類の培養条件は、光強度  $50-100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 14 h L : 10 h D, 培養温度は *H. akashiwo* で  $20^\circ\text{C}$ , *K. mikimotoi* 及び *C. antiqua* で  $25^\circ\text{C}$  とした。また、殺藻及び増殖阻害細菌株については Inaba (2016) より、*H. akashiwo* を対象とする 5 株, *K. mikimotoi* を対象とする 1 株, *C. antiqua* を対象とする 19 株の計 25 株を選抜し、凍結保存されたものを解凍して復活させた後、暗所で室温 ( $20^\circ\text{C}$ ) にて維持培養したものを実験に供した。

$\beta$ -CD に対する藻類の耐性は、滅菌した  $\beta$ -CD を藻類培養に添加し、藻類の増殖をモニターして評価した。まず前培養で藻類を良好に増殖させ、最終的な細胞密度を *C. antiqua* と *K. mikimotoi* では  $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$  オーダーに、*H. akashiwo* は  $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  オーダーの密度になるように改変 SWM-3 培地で希釈し、試験管に接種した。藻類が接種されている試験管に、 $\beta$ -CD 溶液を濃度が 1.0, 10, 100  $\mu\text{M}$  になるように添加し、実験区を設けた。各実験区は 4 本立てとし、改変 SWM-3 培地のみを添加した実験区 ( $\beta$ -CD 無添加) をコントロール区とした。各実験区を上記の培養条件下で培養し、3 日毎に蛍光光度計 (Turner Designs 10-AU Fluorometer) で蛍光値を測定し、藻類の増減を追跡した。

$\beta$ -CD に対する細菌株の耐性は、ペーパーディスク法を用いて検討した。各細菌株を  $\text{ST10}^1$  液体培地で最高密度になるまで 3-5 日間培養し、その後  $\text{ST10}^1$  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, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$  の  $\beta$ -CD 溶液を滴下した。1 細菌株につき 1 枚のシャーレを用意し、上記の培養条件で細菌を塗抹した寒天培地を 2 週間培養の後に、ペーパーディスク周辺に細菌のコロニー形成が阻止されている阻止円 (ハロー) の有無を判別の根拠とした。

殺藻細菌の殺藻機構における QS 機構の検証実験は、藻類と細菌株の二者培養に  $\beta$ -CD を添加することによって行った。まず、 $\beta$ -CD に対する藻類の耐性実験と同様に、各藻類培養に  $\beta$ -CD を添加した実験区を用意し、そこに  $\text{ST10}^1$  液体培地で培養した各細菌を、最終的な細胞密度が  $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$  オーダーになるよう接種した実験区 (液体添加区) を設けた。細菌株と  $\beta$ -CD が無添加の藻類培養をコントロール区、各細菌株を接種して  $\beta$ -CD は添加しない藻類培養を細菌コントロール (BC) 区とし、各実験区を 4 本立てとした。これらの培養を上記の条件下で 2 週間培養し、毎日ターナー蛍光光度計で蛍光値を測定し、藻類の増減をモニターした。また、添加する細菌株を液体培地からではなく、寒天培地上のコロニーから滅菌爪楊枝で接種した実験区 (コロニー添加区) も用意

した。コロニー添加区は上記と同じ藻類培養条件下で 15 日間培養し、実験開始 3 日目から 2 日おきにターナー蛍光光度計で蛍光値を測定し、藻類の増減をモニターした。また、*C. antiqua* と細菌株 19 株のコロニー添加区において、培養 20 日目にコントロール区の試料をグルタルアルデヒドで固定し（終濃度 1%）、DAPI（4', 6-diamidino-2-phenylindole, 終濃度  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）により 5 分間染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて、UV 励起光下で試料中の細菌数の計数及び藻類細胞の検鏡を行った。

#### 【結果】

各藻類の  $\beta$ -CD 耐性実験の結果、 $\beta$ -CD 濃度による藻類の増殖の差異はみられなかった。各細菌株の  $\beta$ -CD 耐性実験においても、各シャーレのペーパーディスク周辺にハローは確認されなかった。以上から、 $\beta$ -CD は対象藻類及び各細菌株の増殖に影響を与えないと結論された。

次に殺藻細菌の殺藻機構における QS 機構の検証実験の結果を示す。*H. akashiwo* と細菌株 6 株の二者培養において、液体添加区では、コントロール区と BC 区及び  $\beta$ -CD 添加区における蛍光値の差異はみられなかった。一方、コロニー添加区では、6 株中 1 株で *H. akashiwo* の殺藻が確認された。

*K. mikimotoi* と 1 株の二者培養において、液体添加区及びコロニー添加区の各実験区での蛍光値の差異はみられなかった。

*C. antiqua* と細菌株 19 株の二者培養実験において、液体添加区では各実験区内の 4 本立てでの蛍光値のばらつきが大きく、実験区内の傾向はみられなかった。コロニー添加区では、 $\beta$ -CD 添加区との差異はみられなかったが、コントロール区と BC 区を比較すると、添加した細菌株によって蛍光値の変化が認められ、蛍光値の増減によって、A) 培養期間中に藻類の増殖がコントロール区と比べ変化しない又は促進されたグループ（殺藻なし）、B) 藻類はある期間まで増殖するが、その後減少したグループ、C) 藻類の増殖が阻害されたグループの 3 グループに分けられた。また、DAPI 染色による試料中の細菌数の計数の結果、グループ B が一番多く（ $10^7$ - $10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  オーダー）、次にグループ A（ $10^6$ - $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  オーダー）、そしてグループ C が一番小さい（ $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  オーダー）という傾向が見られた。DAPI 染色した藻類細胞の検鏡観察によると、グループ B、C で藻類細胞に多量の細菌が群がっているのが確認されたが、グループ A では細菌が藻類細胞中に葉緑体が存在し、細菌が付着していない細胞もみられた。

#### 【考察】

*H. akashiwo* と細菌株の二者培養において液体添加区とコロニー添加区を比較した際、後者で藻類の殺藻がみられた。細菌は液体培地で培養して接種すると遊離状態になり、藻類培地全体で低密度になるが、コロニーから接種すると、藻類培地内で細菌が凝集することで部分的に高密度になる。その結果、細菌の殺藻能が発現したと考えられる。これは細菌密度が一定以上になることで遺伝子発現が制御されるという QS 機構の関与を示唆しているが、 $\beta$ -CD 添加区において蛍光値の差異が確認されなかったため、AI-1 を介するタイプの QS 機構ではないと考えられる。また、コントロール区と細菌添加区における蛍光値の差異が確認されなかった細菌株については、凍結保存からの復活時に殺藻能を失ったことが考えられる。*C. antiqua* の液体添加区で、測定値にばらつきがみられた。これは培養期間中毎日測定を行うことで藻類細胞に負荷を与え、増殖に影響したためと考えられ、実験方法の改善が必要である。*C. antiqua* と細菌株のコロニー添加区では、グループ B、C で培養中の藻類の減少又は増殖阻害、細菌株の増殖と藻類細胞への付着が観察されたことから、細菌株による殺藻及び増殖阻害が行われたと考えられた。しかし、それらの細菌株からも、殺藻機構において明白に AI-1 を介した QS 機構の関与は検出されなかった。

以上のことから、本研究で使用した全ての殺藻細菌株は、殺藻過程において AI-1 を介する QS 機構が関与していないことが示唆された。AI は複数種存在しており、本研究で焦点を当てた AI-1 とは異なる AI が存在することが知られている。中でも AI-2 は多種の細菌で産生・利用が報告されており、異なる細菌種間における情報伝達においても AI-2 の関与が示唆されている。環境中には多種多様な細菌が存在し、殺藻細菌も多くの種が存在する。それゆえ、殺藻細菌においても他細菌種と AI-2 を介した情報伝達を行い、QS 機構を発現させることによって殺藻を行っている可能性も考えられる。今後の展望としては、殺藻機構の解明のために、AI-1 だけでなく、AI-2 やその他の QS 機構の関与を視野に入れて研究していく必要がある。