

学 位 論 文 題 名

Study on Chemical Defense Mechanism
of Seaweeds against Marine Microbes

（海洋微生物に対する海藻の化学的防御機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

Seaweeds are an important entity of the marine ecosystem since they function as the primary producer in the marine food web. However, their existence and survival are dependent on the abiotic factors like temperature, salinity, nutrient and sunlight. They are also subjected to interactions with the biotic factors such as epiphytic bacteria, fungi, algae and interactions between herbivores and plants. In this context, our understanding pertaining to the interaction between seaweeds and microbes, particularly the marine bacteria, is still in its infancy.

This study attempts to explain the presence of seaweed-bacteria interaction and the existence of an antibacterial defense mechanism in seaweeds. Field investigation revealed that *Laminaria religiosa* Miyabe is infected by a bacterial disease that caused thallus lesions and bleaching during early April. In an effort to apprehend this phenomenon, surface bacterial count was enumerated for healthy, diseased and recovered kelp thalli, using three different media formulation. It became clear that bacterial count was highest on diseased kelp, 5830 CFU/cm², while healthy and recovered kelp showed lower counts, 2050 CFU/cm² and 2565 CFU/cm², respectively. Eight species of bacteria were isolated from this kelp, *Alcaligenes aquamarinus*, *Alteromonas* sp., *Azomonas agilis*, *Azotobacter beijerinckii*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp. and *Halococcus* sp. Scanning electron microscope findings gave much needed information on the algal cellular conditions and relative bacterial abundance on the kelp thallus. Subsequent pathogenicity test revealed *Alteromonas* sp. as the pathogenic bacteria by proving Koch's postulates. However, since this kelp was able to survive and recover from this disease by early June, the presence of an antibacterial defense mechanism was anticipated. Hence, the kelp thallus was extracted in methanol and the active compounds were isolated through a "bioassay guided separation" protocol. This step gave four active glycolipids, MGDGs, MGMGs, DGDGs and SQMGs. Prominent antibacterial activities were shown by MGDGs and MGMGs, while DGDGs and SQMGs showed relatively weaker activity. Consecutive efforts showed that the seasonal quantitative fluctuation in these active glycolipids correlated well with the disease dynamics in this kelp. Detailed examination of the abiotic

factors at the study site showed that the onset of this kelp disease coincided with the 60% drop in seawater salinity and a drastic increase in its temperature. These drastic changes in abiotic parameters would have weakened the kelp and made it vulnerable to bacterial intrusion and infection. At this juncture, it was apparent that *Laminaria religiosa* has an inherently available antibacterial defence mechanism to protect itself against any bacterial intrusion.

The second half of this study involves attempts to establish the possible biological role of halogenated secondary metabolites isolated from red algae, *Laurencia* species collected from the Malaysian and Japanese waters. The structures of the isolated compounds were determined through various spectroscopic methods and these compounds were tested for antibacterial activities against bacteria isolated from the respective niches. Specimens collected from the Malaysian waters yielded six halogenated compounds with two new compounds. These compounds were tested for the possible presence of antibacterial activities against 13 species of marine bacteria isolated from the Malaysian algal habitats. Potent antibacterial activities were seen in elatol (1) and iso-obtusol (2). However, lembyne-A (3), 2,3,5,6-tetrabromoinsole (5) and 1-methyl-2,3,5,6-tetrabromoinsole (6) only showed moderate antibacterial activities. While, lembyne-B (4) did not exhibit any antibacterial activity. On the other hand, *Laurencia* species collected from the Japanese waters yielded nine known compounds and two new compounds. Antibacterial activities were tested against eight species of marine bacteria isolated from the Japanese algal habitats. Potent antibacterial activities were seen in laurinterol (12), isolaurinterol (13), cyclolaurenol (14), cupalaurenol (15) and 10-bromo-7-hydroxylaurene (16) including a small amount 10,11-dibromo-7-hydroxy-laurene (17). The two new compounds, mariannenyne (7) and 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (9) showed moderate antibacterial activities. While, 2-bromo-3-chloro-5-acetoxy-chamigra-7(14),9-dien-8-on (8), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (10) and (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (11), showed almost no antibacterial activity. In essence, the isolated halogenated compounds exhibited antibacterial activity against almost 75% of the marine bacteria tested. The possible biological roles of these halogenated compounds are substantial if we contemplate on their distribution in the seaweed's tissues. It has been suggested that these compounds are stored in the organelles called "*corps en cerise*", an unusually swollen refractile inclusion, that are located in the outer cortical layers and trichoblast cell of *Laurencia*. "*Corps en cercise*" are absent in the inner cortical layers, and their specific distribution pattern could be suggestive of their importance as barricades to withhold any bacterial intrusion.

In conclusion, this study has provided valuable information pertaining to the seaweed-bacteria interactions. It is also suggestive that seaweeds employ chemicals as their antibacterial agents in their effort to confront pathogenesis. It became apparent that seaweeds are equipped with an inherently available antibacterial defense mechanism to withstand the harsh demands of the marine environment.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 俊 逸

副 査 教 授 松 田 冬 彦

副 査 教 授 市 村 輝 宣 (大学院理学研究科)

副 査 助 教 授 鈴 木 稔

学 位 論 文 題 名

Study on Chemical Defense Mechanism of Seaweeds against Marine Microbes

(海洋微生物に対する海藻の化学的防御機構に関する研究)

海洋生態系において、海藻類は多くの微生物（バクテリアやカビ）に曝されながら生育している。ある種の海藻は、海洋汚染のひどい沿岸海域でも大きな群落を形成して繁茂している。このことは、これらの海藻が様々な微生物に対して何らかの防御機構を備えていることを示唆している。

本論文は、海洋沿岸域における一次生産者として重要な大型海藻類と周辺海洋微生物との相互作用を解明したものである。申請者は、先ず北海道日本海沿岸に生育するホソメコンブ (*Laminaria religiosa* Miyabe) と周辺海洋細菌との相互作用を明らかにした。

北海道小樽忍路湾のホソメコンブ群落（藻場）では、毎年春先に「白変病」が観測される。この病変（葉体表面に病斑部と白化部が見られる）は、4月初めから中旬にかけて顕著に見られ5月下旬には消失する。申請者は、病変コンブ葉体表面と健全コンブ葉体表面からバクテリアを採取し、定法（形態、染色法、酵素活性など）によって同定するとともに各バクテリアの数を計測した。その結果、病変コンブ表面から8種のバクテリアを同定し、さらに病変コンブ表面のバクテリアは、健全コンブ表面の3倍多く存在することを明らかにした。また、各コンブ表面を走査型電子顕微鏡で観察し、病変コンブ表面ではバクテリアの数が多だけでなく表面細胞が崩壊していることも明らかにした。次に、コッホの原則（Koch's postulates）に従って病原性細菌を同定した。コンブ表面に存在する8種のバクテリアを無菌化した健全コンブに接種したところ、*Alteromonas* sp.のみが健全藻体に対して病変を引き起こしたことから、このバクテリアが病原性細菌であることをつきとめた。

一方ホソメコンブは、5月下旬から6月上旬にかけてこの病気から回復する。そこで化学物質による防御機構の存在を想定してホソメコンブの抽出物について抗菌活性物質のスクリーニングを行い、活性物質として4種のグリセロ糖脂質を同定した。これら糖脂質の中でモノガラクトシルモノアシルグリセロール（MGMG）とモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）は強い抗菌活性を示した。また、これら抗菌活性を示すグリセロ糖脂質

の含有量の変化を調べ、MGMGが5月中旬に約3倍増加していることを明らかにした。さらに、忍路湾における塩濃度、水温、気温の変動をモニターして、4月上旬に塩濃度が急激に低下（60%減少）するとともに、海水温が急激に上昇することを明らかにした。従って、ホソメコンブは、この時期に弱体化しバクテリアに感染し易くなって病気になるが、塩濃度が通常の値（約3%）に戻る5月下旬から6月上旬にかけて、グリセロ糖脂質による抗菌作用によって回復するのではないかと結論している。

次に、紅藻フジマツモ科に属するソゾ属 (*Laurencia*) の海藻が生産している含ハロゲン二次代謝産物による防御機構について明らかにした。

ソゾ属の海藻は、陸上生物には見られない臭素原子や塩素原子を持つ多種多様なハロゲン化合物を生合成している点で大変ユニークな海藻である。しかし、ソゾが何のためにハロゲン化合物を生産しているのかに関してはよく分かっていない。申請者は、これらのハロゲン化合物が海洋微生物に対する化学的防御物質として機能しているのではないかと想定してマレーシア産のソゾと日本産（沖縄県、鹿児島県）のソゾについてハロゲン化合物の同定と抗菌活性を調べた。その結果、マレーシアのソゾからは2種の新規化合物と4種の既知化合物、日本のソゾからは2種の新規化合物と8種の既知化合物を分離しその構造を決定した。これらのハロゲン化合物は、予想通り海洋細菌に対して強い抗菌活性を示し、海洋微生物に対する化学的防御物質として機能している可能性が示唆された。ソゾが生産しているハロゲン化合物は、ソゾ類の表皮細胞に存在するサクランボ小体 (*corps en cerise*) で生合成され貯蔵されることが分かっており、従ってソゾ属の海藻は葉体表面で微生物の感染や侵入をブロックする防御機構を備えていると考えられる。

北海道の重要な水産資源であるホソメコンブに見られる「白変病」に関わる病原細菌の同定と感染を助長する環境要因の解析を含め、コンブが生産する防御物質の同定およびその変動と作用に関する研究結果は、水産学的にも重要であるだけでなく、環境科学的にも高く評価されるべきものである。また、マレーシア産および日本産紅藻ソゾ属数種と周辺バクテリアとの相互作用についても、ソゾが生産するハロゲン化合物による防御機構の存在が初めて明らかにされ今後の研究に大きく寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価するとともに、研究者、研究指導者としても誠実且つ熱心であることなども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。