

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 ピュー ピュー タン

題 目 海洋性溶菌細菌が産生する細胞外タンパク質分解酵素に関する研究  
(Studies on Extracellular Proteolytic Enzymes Produced by Marine Bacteriolytic Bacteria)

現在、種々のプロバイオティクスが水産養殖に使用されており、抗菌性物質の生産、競合、免疫賦活などの作用によって病原菌の消化管内増殖を抑制しているものと考えられている。本研究は、潜在的なプロバイオティクス菌を検索するために、養殖魚の疾病に関係する菌種を多く含む *Vibrio* 属細菌に対して抗菌作用を示す海洋細菌を選別し、溶菌活性を有するタンパク質分解酵素を分離精製して酵素学的な特性について検討したものである。

鹿児島湾沿岸海域から 1080 株の海洋細菌を分離し、二重寒天平板法で *Vibrio* 属細菌に対する増殖阻止帯（生菌平板）および溶菌帯（死菌平板）の有無を調べた。その結果、14 菌株の *Vibrio* 属細菌抗菌性海洋細菌を選別した。これらの菌株は *Vibrio* 属菌以外に他のグラム陰性細菌にも溶菌活性を示したが、グラム陽性細菌に対する溶菌活性は顕著ではなかった。細菌学的性状検査の結果、主要菌株はグラム陰性、運動性、オキシダーゼ陽性、糖発酵性、カゼイン・デンプン・レシチン分解性を示し、*Pseudomonas* 属群の細菌であることが分かった。代表菌株である A1-J25a 株は *Vibrio* 属菌株に対して液体混合培養でも二重寒天平板培養でも増殖阻害と溶菌活性を示した。A1-J25a 株については、16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹から *Pseudoalteromonas* 属細菌と同定された。

*Pseudoalteromonas* sp. A1-J25a 株が産生する細胞外プロテアーゼを、硫酸沈殿、アニオン交換クロマト、ゲルろ過クロマト法を用いて精製した。アニオン交換クロマトでカゼイン分解活性を有する2つの画分(fraction I と fraction II)が得られた。ゲルろ過後の画分を Native-PAGE と SDS-PAGE で純度を検定した。非変性 SDS-PAGE によって fraction I と fraction II の分子量の概数を 42 kDa および 39 kDa と算定した。Fraction I および fraction II protease の最適 pH と温度は、それぞれ pH 11、50°C および pH 9、50°C であった。両酵素は 60°C 以下の加熱処理に対して安定であった。Fraction I protease 活性は PMSF によって阻害されることからセリンプロテアーゼであること、Fraction II protease 活性は EDTA および数種の金属イオンによって阻害されることから金属プロテアーゼであることが明らかになった。

本研究で得られた結果から *Pseudoalteromonas* sp. A1-J25a 株が溶菌活性を有するプロテアーゼを産生することが明らかになったが、詳細な溶菌メカニズムを知る上で既存の溶菌性プロテアーゼの酵素学的および遺伝学的特性と比較検討することが重要である。さらに本菌株が水産養殖におけるプロバイオティクスとして応用できるかどうか検討することが残された課題である。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Phyu Phyu Than

題 目 Studies on Extracellular Proteolytic Enzymes Produced by Marine Bacteriolytic Bacteria  
(海洋性溶菌細菌が産生する細胞外タンパク質分解酵素に関する研究)

It has been known that various probiotic bacteria show antagonism against pathogenic bacteria via antimicrobial substance production or competitive exclusion in the digestive tract of aquaculture fish. This study was undertaken in order to examine the antagonistic activities of marine isolates against pathogen *Vibrio* spp. The proteolytic enzymes causing bacteriolysis of *Vibrio* spp. were purified from the culture filtrate of antagonistic bacteria and examined for their enzymological properties.

A total of 1080 bacterial strains were isolated from seawater of Kagoshima Bay coastal area, Japan in 2001. These isolates were screened by clear zone formation on double-layer agar plates whose top layer contained living cells or heat killed cells of *Vibrio* spp., resulting in the isolation of 14 antagonistic strains. These isolates could lyse the dead cells of gram-negative bacteria more than gram-positive bacteria. Bacteriological tests were conducted on these isolates to characterize and identify them by according to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. All strains were gram-negative motile rods. Most of them were Kovacs' oxidase positive, oxidative in Hugh and Leifson's O/F test and positive in casein, starch and lecithin hydrolysis, and indicated to belong to *Pseudomonas* group. In both agar plate and liquid culture tests, strain A1-J25a exhibited growth inhibition and cell lytic activities against *Vibrio* spp. and selected as a most effective strains for antagonism. Based on 16S rDNA sequence analysis, strain A1-J25a was identified as *Pseudoalteromonas* sp.

Protease produced extracellularly by this strain was purified using ammonium sulfate precipitation, TOYOPEARL SuperQ-650M anion-exchange chromatography and TOYOPEARL HW-55F gel filtration chromatography. Proteolytic activity was found in two fractions, fraction I and II, which were separated using anion-exchange chromatography. The purity of the proteases was confirmed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular weights of fraction I and II proteases were estimated to be approximately 42 kDa and 39 kDa, respectively from the mobility on SDS-PAGE. Purified fraction I protease exhibited optimum activity at pH 11.0 and 50°C and purified fraction II protease showed optimum activity at 9.0 and 50°C, indicating that both enzymes are alkaline proteases. Both enzymes were heat stable up to 60°C. Based on the sensitivity of various inhibitors, fraction I protease was inhibited by phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and identified as a serine protease, while fraction II protease was inhibited by ethylenediamine-tetraacetate (EDTA) and some metal ions and classified as a metal protease.

Based on the results obtained in this study, it is still necessary to compare enzymological and genetic properties of proteases from A1-J25a with those of various bacterial proteases possessing bacteriolytic activity. Furthermore, the present results convincingly indicate that the strain A1-J25a could be of interest for the biological control for pathogenic *Vibrio* spp. in aquaculture systems.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Phyu Phyu Than (ピュー ピュー タン)
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 坂田 泰造
	副査 鹿児島大学 教授 林 征一
	副査 宮崎大学 教授 境 正
	副査 鹿児島大学 教授 田中 淑人
	副査 宮崎大学 教授 酒井 正博
審査協力者	
題目	Studies on Extracellular Proteolytic Enzymes Produced by Marine Bacteriolytic Bacteria (海洋性溶菌細菌が産生する細胞外タンパク質分解酵素に関する研究)
<p>現在、水産養殖において細菌性感染症の予防・治療に抗生物質が使用されているが、耐性菌の出現や抗生物質の残留の問題が生じている。これらの問題を回避・軽減するためにワクチンおよびプロバイオティックスの開発が推進されている。プロバイオティックスとは養殖魚介類に経口投与することによって消化管内で細菌相バランスの改善や病原菌の排除に寄与する微生物細胞またはその生産物を含む製剤のことである。さらに水産養殖におけるプロバイオティックスは環境中の有機物を分解浄化する機能も期待されている。本論文は、ビブリオ病原菌に対して有効なプロバイオティックス細菌を選別することを目的として行われたものである。</p> <p>鹿児島湾沿岸海域から1,080菌株の海洋細菌を分離し、二重寒天平板法で <i>Vibrio</i> 属細菌 (<i>Vibrio harveyi</i>, <i>V. alginolyticus</i>, <i>V. parahaemolyticus</i> 等) に対して増殖阻止帯 (生菌平板) および溶菌帯 (死菌平板) の生成を確認することによって目的とする細菌を検索した。その結果、14菌株の抗 <i>Vibrio</i> 細菌を選別した。これらの菌株は <i>Vibrio</i> 属細菌以外に他のグラム陰性細菌にも溶菌活性を示したが、グラム陽性細菌に対する溶菌活性は顕著ではなかった。細菌学的性状検査の</p>	

結果、主要菌株はグラム陰性、運動性、オキシダーゼ陽性、糖非発酵性、カゼイン・デンプン・レシチン分解性を示し、*Pseudomonas* 属群細菌と仮同定された。代表菌株 A1-J25a 株は *Vibrio* 属菌株に対して液体混合培養でも二重寒天平板培養でも顕著な増殖阻害と溶菌活性を示した。A1-J25a 株について、16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析の結果から *Pseudoalteromonas* 属細菌と同定された。

供試菌株 *Pseudoalteromonas* sp. A1-J25a 株の溶菌活性はタンパク質分解酵素によるものと推定し、本菌株が産生する細胞外プロテアーゼの分離・精製を試みた。菌体培養上清液から硫酸沈殿物を回収し、アニオン交換クロマトグラフィーで分画したところ、2つの活性画分 (Fractions I and II) が得られた。2つの画分を回収してそれぞれゲルろ過クロマトで精製し、Native-PAGE と SDS-PAGE で活性およびタンパク質バンドの検出を確認した。非変性 SDS-PAGE によって Fraction I と Fraction II の分子量の概数を 42 kDa および 39 kDa と算定した。Fraction I および Fraction II protease の最適 pH と最適温度は、それぞれ pH 11、50°C および pH 9、50°C であった。両酵素は 60°C 以下の加熱処理に対して安定であった。Fraction I protease は PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) によって阻害されることからセリンプロテアーゼであること、Fraction II protease は EDTA (ethylenediamine tetra acetate) および数種の金属イオンによって阻害されることから金属プロテアーゼであることが分かった。Fraction I および Fraction II protease とも *Vibrio* 菌体に対する溶菌活性を示すことが明らかになった。

以上の結果から *Pseudoalteromonas* sp. A1-J25a 株が菌体外に *Vibrio* 溶菌活性を有するプロテアーゼを産生することが示されたが、詳細な抗菌メカニズムを解明することおよびプロバイオティクスとして有効かどうかを検討する課題が残されている。

本研究では、新たに分離した海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A1-J25a 株が *Vibrio* 菌株に対して増殖阻害活性および溶菌活性を有していること、さらに本菌株が産生する菌体外プロテアーゼの酵素学的性状および *Vibrio* 溶菌活性を明らかにすることができた。これらの結果は水産養殖におけるプロバイオティクスの開発に関して重要な知見を提供するものとして十分評価できる。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Phyu Phyu Than (ピュー ピュー タン)
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 坂田 泰造
	副査 鹿児島 大学 教授 林 征一
	副査 宮 崎 大学 教授 境 正
	副査 鹿児島 大学 教授 田中 淑人
	副査 宮 崎 大学 教授 酒井 正博
審査協力者	
実施年月日	平成17年12月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成17年12月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的に別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査員会は申請者が博士(水産学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有することを認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	Phyu Phyu Than (ピュー ピュー タン)
<p>[質問 1]: プロバイオティックスとしてこの拮抗細菌を用いるという観点から、この研究の次のステップとしてどのようなことが考えられるか。</p> <p>[回答 1]: 分離した拮抗細菌の甲殻類に対する病原性とバイオコントロール因子としての有用性を確認すること、また拮抗作用として働く溶菌酵素を分離し性状を調べることが考えられる。</p> <p>[質問 2]: 拮抗細菌に近縁である <i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i> について、抗生物質やプロテアーゼ産生などの情報はあるのか。</p> <p>[回答 2]: <i>P. peptidolytica</i> が属する <i>Pseudomonas</i> グループについてはプロバイオティックス、バイオコントロール因子としての利用について報告があるが、<i>P. peptidolytica</i> については、抗生物質や抗菌作用に関する情報は無い。従って、分離菌株と <i>P. peptidolytica</i> との間での比較はできなかった。</p> <p>[質問 3]: プロテアーゼの生成において得られた Fraction I protease は至適 pH が 10-11 である。海水の pH から考えると、海洋環境においては Fraction II protease の方が <i>Vibrio</i> の溶菌に至適のように思うが如何か。</p> <p>[回答 3]: 溶菌活性については、Fraction I、II protease とも同程度の結果が得られた。ただし比活性については検討の余地がある。</p> <p>[質問 4]: プロテアーゼが Co イオンで活性化されているが、海水中の Co イオン濃度はどの程度か、活性化に見合う濃度が存在するのか。</p> <p>[回答 4]: おそらく活性化のテストで用いた 1 mM よりは低いと思われる。1 mM より低い濃度では活性化テストを行っていないので、海水中の Co イオン濃度での活性化の有無は確認できていない。</p> <p>[質問 5]: 特に硫酸分画で回収する際に回収率が低い。粗酵素液についての Native PAGE で 2 本の主要なバンドが得られていることと考え合わせると、major なバンドが硫酸分画で効率よく回収できていないのではないか。</p> <p>[回答 5]: 硫酸分画の過程で十分回収できていない可能性が高い。</p> <p>[質問 6]: 二重寒天平板培地で分離菌株の拮抗作用をアッセイしているが、その拮抗作用が分離菌株が産生する抗菌物質に因るのか、あるいは溶菌酵素に因るのか判別が出来ているのか。</p> <p>[回答 6]: 二重寒天平板培地による試験だけで判別することは難しい。但し、<i>Vibrio</i> の死菌体を用いた場合にも溶菌帯が形成されること、透析により高分子物質に溶菌活性が認められることから、拮抗作用は溶菌酵素によるものと判断した。しかし、本実験だけから溶菌酵素以外の抗菌物質の存在を否定することはできない。</p>	