

(学位第3号様式)

学 位 論 文 要 旨

氏 名

古澤 剛

題 目

海洋性糸状細菌 *Saprospira* spp. の殺藻活性と滑走運動に関する研究
(Studies on Algicidal Activity and Gliding Motility of Marine Filamentous Bacteria *Saprospira* spp.)

真珠稚貝の初期餌料として培養された珪藻細胞が急激に凝集・沈殿する、いわゆる「餌料培養の落ち現象」の原因生物として *Saprospira* 属細菌が分離された。本研究では珪藻に対する殺藻メカニズムを解明することを目的として、鹿児島湾沿岸海水から新たに分離した海洋性糸状細菌 *Saprospira* sp. SS98-5 株を用いて、殺藻活性と滑走運動の観察およびそれらと密接に関係すると考えられる細胞構造の解析を行なった。

まず本菌の殺藻活性と培地中の栄養分の関係について検討した。液体培地および珪藻二重寒天平板による供試菌と珪藻細胞との混合培養の両者において、ポリペプトン低濃度 (<0.05%) 添加区では殺藻活性 (プラーク形成) が顕著に現われたがポリペプトン高濃度 (>0.1%) 添加区では殺藻活性の抑制が見られた。また滑走運動が殺藻性と同様に培地中へのポリペプトンの高濃度添加によって抑制されたことから、滑走運動能も殺藻活性 (プラーク形成) と密接に関係していることが示唆された。

次に透過型電子顕微鏡を用いて殺藻過程の観察を行なった。液体培地での供試菌と珪藻細胞との混合培養において形成される細胞集塊を電顕観察したところ、菌体および破壊された珪藻細胞の珪殻の周囲に電子密度の高い多糖体から成ると思われる粘膜構造が多量に集積していた。これらの粘膜構造によって珪藻細胞が絡め取られたものと考えられる。さらに珪藻二重寒天平板上に形成されたプラーク (溶藻帯) 内部を電顕試料とした場合、供試菌の珪藻細胞への接触、珪殻の局所的溶解および細胞内小器官の小胞化が観察された。これらの観察結果から、本菌株は珪藻細胞の珪殻溶解能を有する直接攻撃型の殺藻細菌であることが明らかになった。

さらに電顕観察によって供試菌株の滑走運動中の細胞質中に多数の束状になった繊維状構造を見出した。これらの細胞内繊維状構造は幅 7 nm、長さ 200-300 nm の繊維が集合したもので、非滑走運動細胞内には全く観察されなかった。細胞から分離精製した繊維状構造を SDS-PAGE に供したところ、61 kDa の単一のタンパク質バンドが検出された。さらに繊維状構造のサブユニット成分 (SCFP) の抗体を用いたウェスタンブロット解析でも SCFP が滑走運動細胞にのみ発現していることが確認された。SCFP をコードしている遺伝子の塩基配列の解析結果では、SCFP と phage tail sheath proteins との間に比較的高い相同性が見られた。

本研究で得られた結果から、細胞内繊維状構造を構成する SCFP が *Saprospira* sp. SS98-5 株の滑走運動細胞にのみ発現していることが明らかになった。今後、SCFP が本菌株の滑走運動と殺藻活性にどのように関係しているかを詳細に検討する必要がある。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Gou Furusawa
題 目	Studies on Algicidal Activity and Gliding Motility of Marine Filamentous Bacteria <i>Saprospira</i> spp. (海洋性糸状細菌 <i>Saprospira</i> spp. の殺藻活性と滑走運動に関する研究)

Cultured microalgal cells for feeding to juvenile fish in aquaculture often aggregate and precipitate rapidly. *Saprospira* spp. isolated from the culture tanks were suspected to cause this phenomenon. In this study, *Saprospira* sp. strain SS98-5 was newly isolated Kagoshima Bay, and we focused our attention on its algicidal activity and gliding motility.

First, effect of polypeptone concentration on algicidal activity of the strain SS98-5 was investigated. Algicidal activity was inhibited by addition of 0.5% polypeptone to the mixed culture of diatom and bacteria cells in liquid medium or double layer agar plate. Gliding motility and colony spread were extensively stimulated on 0.1% polypeptone-containing agar plate, while those were completely inhibited on 0.5% polypeptone-containing agar plate.

Algicidal process of the strain to diatom cells was observed by using a transmission electron microscope (TEM). A large number of electron-dense particles and filamentous materials were detected in the area between the bacterial cells layer and the diatom cell aggregates which were formed by co-cultured bacteria and diatom cells in liquid medium. On the basis of these results, it was suggested that these materials have a role in catching diatom cells. On the double layer agar plate, diatom cells were observed to be contacted with bacteria. The cell walls of diatom cells at the contact sites were partially degraded and finally the diatom cells were lysed completely. It is indicated from these facts that this bacterium is the direct attack type of algicidal bacteria.

Secondly, TEM observation demonstrated that a large amount of fibril structures were found in the cytoplasm of gliding cells of the strain SS98-5. The cytoplasmic fibril structures were shown to be about 7 nm in width and 200-300 nm in length. SDS-PAGE of the structures purified exhibited a single protein band with molecular mass of 61 kDa. A Western immunoblotting analysis indicated that *Saprospira* cytoplasmic fibril protein (SCFP) was significantly expressed in the gliding cells. A whole nucleotide sequence of SCFP gene indicated relatively higher similarity to those of conserved phage tail sheath proteins.

The results obtained in this study suggest the possibility that the cytoplasmic fibril structures expressed in the gliding cells are related to gliding motility of *Saprospira* sp. strain SS98-5. Further work is needed to determine the role of the structure in the gliding motility and algicidal activity of this bacterium.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	古澤 剛
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 坂田 泰造
	副査 鹿児島 大学 助教授 板倉 隆夫
	副査 宮 崎 大学 教授 境 正
	副査 鹿児島 大学 教授 林 征一
	副査 宮 崎 大学 教授 酒井 正博
審査協力者	
題 目	海洋性糸状細菌 <i>Saprospira</i> spp. の殺藻活性と滑走運動に関する研究 (Studies on Algicidal Activity and Gliding motility of Marine Filamentous Bacteria <i>Saprospira</i> spp.)
<p>海産微細藻類を殺藻する種々の殺藻細菌が報告されているが、魚介類の初期飼料として培養された珪藻細胞が急激に溶解し、細胞凝集塊が沈殿する現象の原因菌として <i>Saprospira</i> spp. が分離された。<i>Saprospira</i> 属細菌は、他の細菌を捕捉して溶解することが報告されており、殺藻および溶菌作用が注目されている。本論文は、鹿児島湾沿岸海水から新たに分離された海洋性糸状細菌 <i>Saprospira</i> sp. SS98-5 株を用いて、殺藻過程と滑走運動性に密接に関係すると考えられる新規の細胞内構造物およびその遺伝子の特定と構造解析を行ったものである。</p> <p>藻類培養用の液体培地および寒天二重平板培地で本菌株と珪藻細胞を混合培養すると、前者では藻類細胞の溶解による濁度の低下、後者では二重寒天層に溶藻斑（ブランク）が観察された。混合培養の培地中にポリペプトン無添加か低濃度添加（0.1%以下）した場合は溶藻活性が顕著に発現したが、ポリペプトン高濃度（0.2%以上）添加では溶藻現象は見られず、同時に本菌株の滑走運動もほとんど観察されなかった。これらの事実は、培地中のポリペプトン（有機物濃度）が溶藻活性および滑走</p>	

運動能の発現を制御していることを示唆している。

そこで透過型電子顕微鏡を用いて液体混合培養中に形成された細胞集塊を観察したところ、溶藻過程の珪藻細胞の周囲に電子密度の高い粘液物質（多糖体構造と推定）と多数の菌体の集積が見られ、菌体から産生された粘液物質によって珪藻細胞が捕捉されたものと推定された。珪藻二重寒天平板上に形成されたプラーク内部では、珪藻細胞への菌体の接触、珪藻細胞の局所的溶解と細胞小器官の小胞化が観察された。これらの電顕観察の結果から、本菌株は珪藻細胞に対して珪殻（細胞壁）溶解活性を有する直接攻撃型の殺藻細菌であることが示された。

さらに電顕観察によって、本菌株の滑走運動中の細胞質内に多数の束状になった繊維状構造物が見いだされた。これらの細胞内繊維状構造物は幅 7 nm、長さ 200-300 nm のタンパク質性繊維が集合したもので、非滑走運動細胞では全く観察されなかった。真核生物の微小管重合阻害剤であるポドフィロトキシンを添加して培養するとこれらの細胞内繊維状構造物は観察されず、滑走運動も見られなかった。滑走運動能を有した菌体から繊維状構造物を分離精製し SDS-PAGE 分析を行ったところ、61 kDa の単一タンパク質バンドが検出された。この繊維状構造物サブユニット成分 (SCFP; *Saprospira* cytoplasmic fibril protein) のウサギ抗体（ポリクロナール）を作成し、ウエスタンイムノブロット解析に供したところ、SCFP が滑走運動細胞にのみ発現していることが確認された。そこで SCFP の部分アミノ酸配列から設計した primers を用いて SCFP 遺伝子の全塩基配列 1,500 bp を決定した。さらに TAIL-PCR 法を用いて SCFP 遺伝子周辺領域を含めた 5,032 bp の塩基配列を決定し、DNA データベース上で相同性検索を行ったところ、SCFP 遺伝子の上流域に 2 個、下流域に 2 個の計 4 個の ORF が見いだされ、さらに SCFP を含めて 3 個の ORF が phage tail region proteins との相同性が高いことが明らかになった。これらの結果は、phage 遺伝子が細菌染色体に組み込まれて欠損プロファージとなり、新しい機能を獲得した可能性が考えられる。

本研究では滑走運動中の殺藻性糸状細菌の細胞内に特異的な繊維状構造物が形成されるのを見出し、構成タンパク質を分離してその遺伝子構造を明らかにした。これらの結果は殺藻細菌の滑走運動能と殺藻機構の関係を明らかにする上で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	古澤 剛
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 坂田 泰造
	副査 鹿児島大学 助教授 板倉 隆夫
	副査 宮崎大学 教授 境 正
	副査 鹿児島大学 教授 林 征一
	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。) (口答)・筆答	
<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	古澤 剛

[質問 1]: 珪藻を直接溶解する細菌はいるのか。

[回答 1]: 珪藻溶解細菌についての報告はいくつかあるが、珪殻を直接溶解する過程についての報告例は見あたらない。

[質問 2]: 珪殻に含まれるタンパク質（シラフィン）とはどんなタンパク質か。

[回答 2]: メカニズムはまだ研究中の段階だが、シラフィンが珪素を含む基本構造を凝集させて珪殻を作っていると考えられている。*Saprospira* 属はこのタンパク質を分解することによって、珪殻を分解しているのではないかと考えている。

[質問 3]: シラフィンが珪殻表面に露出していないと分解されないのではないのか。

[回答 3]: シラフィン分子が直接露出はしてないと思われる。

[質問 4]: エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 (EF-TEM) はどのようにして元素を同定できるのか。

[回答 4]: 反射した電子線情報をコンピュータ処理により、元素の同定がなされる。水素以外のほぼ全ての元素の同定とマッピングが可能である。

[質問 5]: 滑走とはどのような運動なのか。

[回答 5]: 寒天などの固形物表面を細胞集団が滑りながら運動し、移動する。

Saprospira 属の滑走運の場合、SCFP 構造物が関与しているのではないか。

[質問 6]: SCFP の SDS-PAGE 上の分子量 (61 kDa) と演繹アミノ酸配列から推定された分子量 (53 kDa) に差があるのはなぜか。

[回答 6]: その差は説明できていないが、S-S 結合が影響していることも考えられる。

[質問 7]: SCFP の N 末端のブロックについてはどうか。

[回答 7]: N 末端がブロックされていて分析できなかった。

[質問 8]: ペプチドマッピングにおいて、もっと多くのペプチド断片が得られたのではないか。

[回答 8]: 本実験では 3 種のペプチド断片をランダムに選んでペプチドシーケンシングを行ったが、うち 1 種には問題があったため、2 種のペプチド断片についてペプチドシーケンスを得た。

[質問 9] : SCFP 構造物の存在と滑走運動とはどのように関連していると考えているのか。

[回答 9] : 滑走運動時の細胞にのみ繊維状構造物が見られ、SCFP 遺伝子が確かに発現しているということは明らかになった。しかし繊維状構造物が滑走運動に直接関与しているという証拠は得られていない。将来的には、SCFP 遺伝子の破壊による滑走運動の変化を追うことにより、SCFP と滑走運動の関連性を明らかにする必要がある。あるいは、有機物濃度が低いときにのみ発現するが、滑走運動とは直接関係のない構造タンパク質である可能性も否定できない。

[質問 10] : *Saprospira* 属が他の藻類細胞やバクテリアを殺滅する作用を有しているという報告はあるのか。

[回答 10] : *Saprospira* 属細菌は一般的に原核生物の捕食者として位置付けられているが、SS98-5 株の殺菌作用については試験していない。SS98-5 株が、*Heterosigma* や *Chattonella* など他の藻類に対しても殺藻活性を示すことが分かっている。

[質問 11] : 振とう培養などにより細胞長が短くなったり殺藻活性が失われるような現象は見られなかったか。

[回答 11] : 液体培養では平板培地に比べると細胞鎖長が短くなる傾向が見られるが、殺藻活性や滑走運動性が失われる事はなかった。

[質問 12] : SCFP がファージ尾部関連タンパク質との相同性があるとの議論をするためには、相同性がある領域のアミノ酸配列のアライメントなどのデータが必要ではないか。特に、phage tail region proteins のモチーフ領域に相同性があるならば、SCFP 遺伝子がファージ由来であることが推測できる。その証拠として、アライメントなどのデータが必要と思われる。

[回答 12] : モチーフ検索によって、phage tail sheath proteins のモチーフを持っていることは確認している。アライメントデータについては、今後検討したい。

[質問 13] : 珪藻細胞を溶解する酵素を分泌している可能性はあるのか。

[回答 13] : 珪藻細胞と SS98-5 株の混合培養液上清を濃縮して珪藻細胞に添加した場合に溶藻が見られなかったため、大量の溶解酵素を分泌しているとは考えにくい。しかし、珪藻細胞と接触した部位で局所的に何らかの分解酵素が働いている可能性は考えられる。