

## 学 位 論 文 要 旨

|  |  |
|--|--|
| 氏 名  | Md. Iftekharul Wahid (Md. イフテカルル ワヒド)  |
| 題 目  | 海産ラビリントチュラ類の溶菌活性に関する研究<br>(Studies on Bacteriolytic Activities of Marine Labyrinthulids) |
| <p>鹿児島湾の沿岸域およびフィリピンのパナイ島バタン湾からラビリントチュラ類13株を珪藻二重寒天培地を使用して分離した。分離したラビリントチュラ細胞は細菌死菌体と卵黄を添加した栄養培地(NSBEY)上で無菌的に増殖した。代表株3株は、18S rDNA塩基配列の解析からラビリントチュラ系統発生群(LPG)に属することが示された。ラビリントチュラ分離株についての加水分解試験で、代表株は澱粉のような高分子物質を分解できることが分かった。また4株についてAPI-ZYMキットを使用して酵素活性の検出を行った所、アルカリホスファターゼ、ロイシンアシルアミターゼ、バリンアシルアミターゼの酵素活性が顕著に高かった。二重寒天平板および液体培養液を用いた溶菌活性試験では、分離株がグラム陰性細菌の死菌体を溶解するがグラム陽性菌の死菌体は溶解できないことが分かった。これらの溶菌活性の至適温度範囲は25~31℃であった。呼吸阻害であるシアン化ナトリウム、ジニトロフェノールやアジ化ナトリウムは溶菌活性を抑制したが、ラビリントチュラ細胞の生存には影響が見られなかった。フィリピン分離株00-Bat-05をグラム陰性菌死菌体を懸濁したL字管で回転培養した場合、培養後期に黄橙色のカロテノイド色素が蓄積され、同時に活発な運動性を有する遊走子を形成することが見出された。</p> <p>次に海産ラビリントチュラ00-Bat-05株とヤブレッツボカビHR-3株について細胞からロイシンアミノペプチターゼ(LAPs)を分離精製し、酵素学的性状を比較検討した。両株由来のLAPsの至適温度は37℃であった。また00-Bat-05株LAP酵素の耐熱性は60℃、10分間の熱処理でも最大活性の80%が残存していたのに対し、HR-3株のLAP活性は60℃の熱処理で完全に失活した。両株由来のLAP活性の至適pHはpH8.0付近であった。両株のLAPsは1,10-フェナンスロリン、PCMB、ベスタチンおよびSDSによって顕著に阻害された。00-Bat-05株由来のLAP活性は<math>Co^{2+}</math>によって促進され、<math>Zn^{2+}</math>によって阻害された。一方、HR-3株由来のLAP活性は<math>Co^{2+}</math>と<math>Zn^{2+}</math>の両者によって阻害された。00-Bat-05株のLAPはL-ロイシン-p-ニトロアニリドに高い基質特異性があったがHR-3株の酵素は種々のL-アミノ酸p-ニトロアニリド誘導体に対して比較的広い基質特異性が見られた。ラビリントチュラ00-Bat-05株細胞から部分精製して得られたLAP画分は、00-Bat-05株細胞と同様に<i>Vibrio parahaemolyticus</i>死菌体の溶菌活性を有していることが明らかになった。</p> |  |

## 学 位 論 文 要 旨

|     |   |
|-----|---|
| 氏 名 | Md. Iftekharul Wahid  |
| 題 目 | Studies on Bacteriolytic Activities of Marine Labyrinthulids<br>(海産ラビリンチュラ類の溶菌活性に関する研究) |

Thirteen strains of labyrinthulids were isolated from the coastal area of Kagoshima Bay, Kagoshima Prefecture, Japan and from Batan Bay, Panay Island, the Philippines by using diatom double-layer agar plates. The cells of labyrinthulid isolates grew axenically on the bacterial dead cells and extract plus egg yolk agar medium (NSBEY agar). Three representative isolates were demonstrated to belong to the labyrinthulid phylogenetic group (LPG) based on 18S rDNA sequence analysis. In the hydrolysis test of labyrinthulid isolates, it was found that they could hydrolyse macromolecular compounds like starch. Ten enzymes were detected by using API-ZYM kit in four representative isolates. Three enzymes including alkaline phosphatase, leucine arylamidase and valine arylamidase were found in higher level in API-ZYM tests. As examined their bacteriolytic activity, it was found that they could lyse only the dead cells of Gram-negative bacteria and not those of Gram-positive bacteria during incubation in both agar and liquid media. The optimum temperature range for their bacteriolysis was from 25 to 31°C. Respiratory inhibitors such as sodium cyanide, dinitrophenol and sodium azide had repressed bacteriolysis activity but no impact on viability was found in *Labyrinthula* cells of a strain 00-Bat-05, Philippine isolate. Orange carotenoid pigment(s) was accumulated during stationary growth phase of strain 00-Bat-05, cultured in an L-shape tube containing a bacterial dead cell suspension and concomitantly rapid cell movement of developing zoospores was observed.

Leucine aminopeptidases (LAPs) from marine labyrinthulid strain 00-Bat-05 and thraustochytrid strain HR-3 cells were partially purified and characterized by enzymological properties. The optimum temperature of LAPs from both strains was 37°C. The thermostability of 00-Bat-05 LAP was indicated by having 80% of maximum activity after heat treatment at 60°C for 10 min, while LAP activity of strain HR-3 was completely inactivated at 60°C. LAP activities from both strains were high at near pH 8.0. Both LAPs were inhibited by 1,10-phenanthroline, *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB), bestatin and sodium dodecyl sulphate (SDS). Enzyme activity of LAP from strain 00-Bat-05 was stimulated by Co<sup>2+</sup> and inhibited by Zn<sup>2+</sup>, while that from HR-3 was inhibited by Co<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. LAP of 00-Bat-05 had a high specificity for L-leucine-*p*-nitroanilide but HR-3 enzyme showed relatively broad specificity for *p*-nitroanilide derivatives of L-amino acids. Partial purified LAP enzyme, from labyrinthulid sp. strain 00-Bat-05, showed the bacteriolysis activity against the dead cells of *Vibrio parahaemolyticus* which phenomenon was also found by the cells of strain 00-Bat-05.

| 学位論文審査結果の要旨  |  |
|--|--|
| 学位申請者<br>氏 名   | Md. Iftekharul Wahid   |
| 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 前田 昌調   |
|  | 副査 鹿児島大学 教授 野呂 忠秀  |
|  | 副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎  |
| 審査協力者  |  |
| 題 目  | Studies on Bacteriolytic Activities of Marine Labyrinthulids<br>(海産ラビリントウ類の溶菌活性に関する研究) |
| <p>ラビリントウ類は海洋環境中の海藻・海草類や枯葉等の固形物表面に付着し、細菌・珪藻類の摂食や有機物の分解過程に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究は、鹿児島湾沿岸域およびフィリピン、パナイ島のバタン湾から分離されたラビリントウ類分離株について、細菌摂食および有機物分解過程を解明することを目的として、細菌細胞の溶菌活性およびタンパク質分解活性と関連したロイシンアミノペプチダーゼ(leucine aminopeptidase, LAP)の酵素学的性状を明らかにしたものである。</p> <p>鹿児島湾沿岸域およびフィリピン、パナイ島バタン湾からラビリントウ類13株を珪藻二重寒天培地を使用して分離した。珪藻二重寒天平板上に採取した海藻やマングローブ葉体の断片を乗せ、23℃、光照射下で1週間培養した場合、葉体断片の周囲に珪藻細胞が溶解した溶藻帯が形成される。溶藻帯をスライドガラスに塗抹して顕微鏡観察すると典型的な紡錘細胞の集塊が見られるので、これらの細胞集塊を植え継ぐことによってラビリントウ株を分離した。次にラビリントウ株の単培養に最適な培地について検討した。その結果、珪藻二重寒天平板で分離したラビリントウ株を細菌死菌体と</p> |  |

卵黄を添加した栄養培地(NSBEY)上で無菌的に増殖させることができた。さらに NSBEY 培地で培養した代表 3 株の菌体から DNA を抽出し、18S rDNA 塩基配列の解析を行った。代表 3 株はラビリンチュラ系統発生群(LPG)に属することが示された。ラビリンチュラ分離株についての加水分解試験で、代表株はデンプンおよびカゼインを分解できることが分かった。また代表 4 株について API-ZYM キットを使用して酵素活性の検出を行った所、アルカリホスファターゼ、ロイシンアリルアミターゼ、バリンアリルアミターゼの酵素活性が顕著に高かった。二重寒天平板および液体培養液を用いた溶菌活性試験では、分離株がグラム陰性細菌の死菌体を溶解するがグラム陽性菌の死菌体は溶解できないことが分かった。これらの溶菌活性の至適温度範囲は 25~31°C であった。呼吸阻害剤であるシアン化ナトリウム、ジニトロフェノールやアジ化ナトリウムは溶菌活性を抑制したが、ラビリンチュラ細胞の生存には影響が見られなかった。フィリピン分離株 00-Bat-05 をグラム陰性菌死菌体を懸濁した L 字管で回転培養した結果、培養後期に試験管壁に吸着した細胞内に黄橙色のカロテノイド色素が蓄積され、同時に活発な運動性を有する遊走子を形成することが見出された。

次に海産ラビリンチュラ 00-Bat-05 株とヤブレッツボカビ HR-3 株について細胞からロイシンアミノペプチターゼ(LAPs)を分離精製し、酵素学的性状を比較検討した。両株由来のLAPsの至適温度は37°Cであった。また00-Bat-05株 LAP酵素の耐熱性は60°C、10分間の熱処理でも最大活性の80%が残存していたのに対し、HR-3株のLAP活性は60°Cの熱処理で完全に失活した。両株由来のLAP活性の至適pHはpH8.0付近であった。両株のLAPsは1,10-フェナンスロリン、PCMB、ベスタチンおよびSDSによって顕著に阻害された。00-Bat-05株由来のLAP活性は $\text{Co}^{2+}$ によって促進され、 $\text{Zn}^{2+}$ によって阻害された。一方、HR-3株由来のLAP活性は $\text{Co}^{2+}$ と $\text{Zn}^{2+}$ の両者によって阻害された。00-Bat-05株のLAPはL-ロイシン-p-ニトロアニリドに高い基質特異性があったがHR-3株の酵素は種々のL-アミノ酸p-ニトロアニリド誘導体に対して比較的広い基質特異性が見られた。ラビリンチュラ00-Bat-05株細胞から部分精製して得られたLAP画分は、00-Bat-05株細胞と同様に *Vibrio parahaemolyticus* 死菌体に対する溶菌活性を有していることが明らかになった。

以上のように、本論文は海洋環境から分離したラビリンチュラ株の細菌溶菌活性とLAP活性(exopeptidase 活性)の性状および相関関係について明らかにし、海洋環境における有機物分解過程を解明する上で有益な知見を提供するものと評価される。従って、博士(水産学)の学位論文として十分な価値を持つものと判定した。

| 最終試験結果の要旨  |                      |
|--|----------------------|
| 学位申請者<br>氏 名   | Md. Iftekharul Wahid |
| 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 前田 昌調    |
|  | 副査 鹿児島 大学 教授 野呂 忠秀   |
|  | 副査 鹿児島 大学 教授 八木 史郎   |
| 審査協力者  |                      |
| 実施年月日  | 平成 20年1月11日          |
| 試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)   |                      |
| (口答)・筆答  |                      |
| <p>主査および副査は、平成20年1月11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、関連事項について諮問を行った。具体的には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、審査委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と認めた。</p> |                      |

学位申請者  
氏 名

Md. Iftekharul Wahid

[質問1] ラビリンチュラ類は原生生物であるが、遊走子(zoopores)はどのようなタイプのものか、核相は単相(haploid)なのか、複相(diploid)なのか？

[回答1] ラビリンチュラ(*Labyrinthula* spp.)の遊走子形成(zooporation)では、まず紡錘形の栄養細胞が集合して球形の細胞に変形する。この時、核内の染色体は2対の中心体に結合して分離し、核の分裂に伴って細胞の分裂が起こる。最終的に8個の球形細胞が生じ、これらが複鞭毛(biflagellar)を持った遊走子に分化する。遊走子は固形物表面に定着し、再び紡錘形の栄養細胞に分化する。このようにラビリンチュラの遊走子は細胞分裂によって形成されるので単相(haploid)であると言える。

[質問2] ラビリンチュラ分離株はなぜグラム陰性菌の菌体のみ溶菌し、グラム陽性菌は溶菌しないのか？

[回答2] 試験に用いた菌株はグラム陽性菌3株、グラム陰性菌5株であるので完全に一般化できるかはさらに検討の余地がある。しかし試験した範囲内ではグラム陰性菌のみ溶菌した。グラム陽性菌の細胞壁の主成分はpeptidoglycan(多糖類)であり、グラム陰性菌細胞壁はpeptidoglycanの他にlipoprotein、lipopolysaccharideやproteinから構成されている。従ってグラム陰性菌細胞壁の方がタンパク分解酵素protease(exopeptidase)によって分解され易いとが考えられる。ちなみに海水中ではグラム陰性菌が優勢であり、生態学的にも整合性がある。

[質問3] ラビリンチュラの溶菌活性について研究しているが、なぜ分解酵素としてleucine aminopeptidase(LAP)を選択したのか？

[回答3] ラビリンチュラが細菌や珪藻細胞を摂食分解することが知られており、タンパク質分解酵素が重要な役割を演じていると考えられる。そのなかでAPI-ZYMキットで加水分解酵素類を測定した結果、leucine arylamidase活性が顕著であったこと、アミノペプチダーゼ活性が合成基質を使用して容易に測定できることなどからLAP活性を選択した。

[質問4] LAP酵素はグラム陰性菌細胞壁のどの成分を分解していると考えられるのか？

[回答4] アミノペプチダーゼはexopeptidase の1種でタンパク質のN末端から順次アミノ酸を切断する。そこで2つの可能性が考えられる。1つには細胞壁中のタンパク質成分を加水分解し、他はペプチドグリカン分子中のペプチド結合を切断することが考えられる。この場合、グラム陰性菌の細胞壁成分に対して特異性があるのかも知れない。参考として細菌のタンパク質分解酵素によって他の細菌の溶菌が起こるといふ報告がある。本実験では、菌体を熱処理しているので生細胞の細胞壁より分解され易くなっていることが考えられる。

[質問5] *Vibrio parahaemolyticus* 菌の生菌体について溶菌を調べたか？ またタンパク分解酵素ではなくペプチダーゼによって溶菌現象が説明できるのか？

[回答5] 液体培養法および寒天平板法で生菌体について溶菌を調べたが、細菌が急速に増殖し、ラビリンチュラの増殖を凌駕して試験管内では溶菌を確認することは出来なかった。自然界ではもっと細菌増殖が遅いので細菌細胞の摂食または溶菌が起こっていると考えられる。これらの問題に関しては、試験管内で生細胞の溶菌を再現できる条件について検討する必要がある。本実験で調べたLAP活性は、基質としてleucine *p*-nitroanilide を用いて加水分解活性を測定しているのでprotease のなかのexopeptidase 活性を測定していることになる。またprotease としてはLAP活性以外の活性も存在するので、今後はprotease 活性の総体を測定する必要がある。

[質問6] スライドの最初に示されたラビリンチュラ類の生活環の図は、顕微鏡観察の結果に基づいて作成されたものか？

[回答6] これらの図は、「Hand Book of Protoctista; Phylum Labyrinthulomycota」(Porter, 1990)から引用したものである。博士論文には引用文献を明示するようになりたい。