

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	カルメロ セゴビア デル カスティヨ
題 目	抗ビブリオ細菌が産生する抗ビブリオ物質の抗菌活性と化学構造 (Antibiotic Activity and Chemical Structure of Anti- <i>Vibrio</i> Substances from <i>Vibrio</i> Antagonistic Bacteria)
<p>ビブリオ属細菌は海水中に生育するグラム陰性細菌で、その中のいくつかの菌種は海産魚類、貝類、甲殻類の感染症の原因になっている。水産養殖におけるビブリオ感染症を防御する手段として、抗生物質、プロバイオティクス、ワクチンなどの方法が考えられる。本研究の基本的な目的は、<i>Vibrio harveyi</i>を含む病原菌の防御に有効なプロバイオティック菌株の探索にある。</p> <p>まず最初に、Z-CII 二重寒天平板を用いて鹿児島湾周辺海域から抗ビブリオ細菌の分離を試みた。その結果、抗ビブリオ細菌が分離出来たが、その大部分は海水中の海藻付着細菌 (66%) として生育しており、ヒラメやクルマエビからは分離されなかった。自己阻害活性を示すものも約 30%存在したが、主として色素産生の抗ビブリオ細菌を選択的に分離した。</p> <p>大部分の分離菌株は、運動性、グラム陰性桿菌、グルコース酸化的分解、塩分要求性を示したので、<i>Pseudomonas</i> 属または <i>Vibrio</i> 属と同定された。最も抗菌活性の顕著であった A1-J10 と A1-J11 株は 16S rDNA のホモロジー検索の結果、<i>Pseudoalteromonas</i> 属に分類されることが分かった。</p> <p>抗菌細菌 A1-J10, A1-J11 および A1-J17 株の培養上清液から、酢酸エチルで抗ビブリオ活性物質が抽出された。特に A1-J11 株の培養上清液から、酢酸エチル (またはクロロホルム) で抽出し、シリカゲルクロマト、RP-HPCL(Mightysil RP-18 GP) を用いて分離した場合に3つの (AVS-03a, c, dと仮称) 活性ピークが得られた。</p> <p>3つの活性ピークは 215、235、315、327 nm 付近に吸収極大が見られ、構造的に類似した化合物であることが示唆された。これらの成分は 100°Cの加熱および pH 4.0 以上の pH 域で安定であった。また魚病細菌 <i>Vibrio harveyi</i> 菌株に対して強い阻害活性を示したが、<i>V. alginolyticus</i> 菌株にはほとんど阻害活性を示さなかった。</p> <p>抗菌物質 AVS-03a と AVS-03dは質量分析および NMR 分析の結果に基づいて、それぞれ 2-n-butyl-4-quinolinol (C₁₃H₁₅NO)、2-n-pentyl-4-quinolinol (C₁₄H₁₇NO) と同定された。他の合成 quinolinol 化合物と <i>V. harveyi</i> に対する阻害活性を比較した結果、抗菌活性にはアルキル側鎖の長さが重要であることが示唆された。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Carmelo Segovia del Castillo
題 目	Antibiotic Activity and Chemical Structure of Anti- <i>Vibrio</i> Substances from <i>Vibrio</i> Antagonistic Bacteria (抗ビブリオ細菌が産生する抗ビブリオ物質の抗菌活性と化学構造)

Vibrio spp. are ubiquitous gram-negative bacteria, some strains of which have been associated with disease in marine shellfish, fish, and crustaceans. Several methods have been suggested to combat *Vibrio* infection in aquaculture systems including the use of antibiotics, probiotics, vaccination, and bio-control. The purpose of this study was to look for potential probiotic strains that can control the growth of fish pathogens including *Vibrio harveyi*.

Several *Vibrio* antagonistic bacteria have been isolated from several areas around Kagoshima Bay in Kagoshima, Japan using a Z-CII double layer agar technique. Most of these antagonistic isolates (66%) were isolated from macroalgae; none were isolated from culture waters of Japanese flatfish or Kuruma shrimp. Autoinhibition was fairly high at 30% but this may be explained by the prejudice in choosing of pigmented strains for isolation.

Standard tests show that most isolated bacteria were motile, oxidation with glucose, gram negative short rods, and require NaCl for growth. They were classed tentatively as *Pseudomonas* spp. or as *Vibrio* spp. Phylogenetic analysis using 16S rDNA identified two of the active strains, A1-J10, and A1-J11, as *Pseudoalteromonas* spp.

Extraction of anti-*Vibrio* substances from the culture supernatant of antagonistic bacteria by using ethyl acetate was possible with strains A1-J10, -J11, and -J17. Further studies determined that attempting to isolate anti-*Vibrio* substances from A1-J11 would be best. The supernatant of A1-J11 was extracted with organic solvent (chloroform or ethyl acetate) then purified in Silica Gel 60 and RP-HPLC (Mightysil RP-18 GP Aqua) showing three peaks with anti-*Vibrio* activity designated as AVS-03a, c, and d.

All three substances have λ_{max} at 215, 235, 315, 327 nm in methanol, implying a similarity in structure. The three anti-*Vibrio* substance were thermostable up to 100°C and AVS-03d was pH-stable over the pH range higher than 4.0, and also showed strong inhibitory activities specifically against *Vibrio harveyi* strains, but less effectivity against *V. alginolyticus*.

The chemical structures of AVS-03a and AVS-03d, was determined as 2-*n*-butyl-4-quinolinol ($C_{13}H_{15}NO=201.27$) and 2-*n*-pentyl-4-quinolinol ($C_{14}H_{17}NO=215.13$), respectively on the basis of mass spectrometry and NMR spectroscopy. AVS-03d possessed higher inhibitory activity against *Vibrio harveyi* strains as compared with other quinolinol compounds, suggesting that the length of alkyl side chain of the compound is important for anti-bacterial activity.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	Carmelo Segovia del Castillo
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 田中 淑人
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 教授 小山 次朗
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
題目	Antibiotic Activity and Chemical Structure of Anti- <i>Vibrio</i> Substances from <i>Vibrio</i> Antagonistic Bacteria (抗ビブリオ細菌が産生する抗ビブリオ物質の抗菌活性と化学構造)
<p>ビブリオ属細菌は海水中に生育するグラム陰性細菌で、その中のいくつかの菌種は海産魚類、貝類、甲殻類の感染症の原因になっている。水産養殖におけるビブリオ感染症を防除する手段として、抗生物質、プロバイオティクス、ワクチンなどの方法が考えられている。本研究の基本的な目的は、<i>Vibrio harveyi</i> を含む魚病原因菌の防除に有効なプロバイオティック菌株の探索にある。</p> <p>まず最初に、Z-CII 二重寒天平板を用いて鹿児島湾周辺海域から抗ビブリオ細菌の分離を行った。その結果、抗ビブリオ細菌が多数分離出来たが、その大部分は海水中の海藻付着細菌 (66%) として分離されたもので、ヒラメやクルマエビ飼育水からは分離されなかった。本研究における主要な供試菌株として、黄橙色の菌体色素を産生し、抗ビブリオ活性を示す菌株を選択的に分離した。大部分の分離菌株は、運動性、グラム陰性桿菌、グルコース酸化的分解、塩分要求性を示した。これらの菌株の中で抗菌活性の顕著であった A1-J10 と A1-J11 株は 16S rDNA のホモロジー検索の結果、<i>Pseudoalteromonas</i> 属に分類されることが分かった。</p>	

抗菌細菌 A1-J10 および A1-J11 株を海水培地 (Z-CII 液体培地) で培養し、得られた培養上清液から酢酸エチルで抽出した画分中に抗ビブリオ活性が検出された。そこで A1-J11 株の培養上清液から、酢酸エチル (またはクロロホルム) で抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC (Mightysil RP-18 GP) を用いて分離した所、3 つの主要な (AVS-03a、c、d と仮称) 活性画分が得られた。

3 つの活性画分をメタノールに溶解して紫外吸収スペクトルを測定した所、215、235、315、327 nm 付近に吸収極大が見られ、それぞれ構造的に類似した化合物であることが示唆された。これらの成分は 100°C の加熱および pH 4.0 以上の pH 域で安定であった。また魚病細菌 *Vibrio harveyi* 菌株に対して強い阻害活性を示したが、*V. alginolyticus* 菌株にはほとんど阻害活性を示さなかった。活性画分の中では AVS-03d が生産量も多く、活性も強かった。

抗菌物質 AVS-03a と AVS-03d について質量分析 (ESI-MS、MALDI-TOF-MS) および NMR (JEOR ECA-600) 分析に供した。前者は、ヒドロキシキノリン環と C 数 4 個のアルキル基を有しており 2-*n*-butyl-4-quinolinol ($C_{13}H_{15}NO$) と同定された。また後者は、ヒドロキシキノリン環と C 数 5 個のアルキル基を有しており 2-*n*-pentyl-4-quinolinol ($C_{14}H_{17}NO$) と同定された。そこで他の合成 quinolinol および isoquinolinol 化合物と抗菌活性について比較した結果、AVS-03d (2-*n*-pentyl-4-quinolinol) は *V. harveyi* および *V. fischeri* 菌株に対して顕著な抗菌活性を示したのに対して、2-methyl-4-quinolinol がこれらの菌株に対して高濃度では抗菌活性が検出されたが、その他の quinolinol 化合物では全く抗菌活性は検出されなかった。これらの結果から、alkyl-quinolinol 化合物の抗菌活性は少なくとも C 数 4 個から抗菌活性が顕著になり、これらの化合物の抗菌活性にはアルキル側鎖の長さが重要であることが示唆された。alkyl-quinolinol 化合物の抗菌作用のメカニズムとしてチトクローム系における電子伝達鎖の阻害によるという報告がある。

以上のように、本論文は海洋環境から分離した *Pseudoalteromonas* sp. A1-J11 株が培養上清液中に産生する抗ビブリオ物質の化学構造と抗菌活性について解明し、水産養殖における感染症の微生物学的防除を考える上で有益な知見を提供するものと評価され、博士 (水産学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Carmelo Segovia del Castillo
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 田中 淑人
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 教授 小山 次朗
	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 8月 5日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成20年8月5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

Carmelo Segovia del Castillo

[質問 1] 拮抗細菌のサンプリングにおいて、特に海藻試料からの分離が多かったが、拮抗細菌が海藻に多く分布している理由についてどのように考えられるのか？

[回答 1] 海洋環境に分布する細菌は浮遊細菌と付着細菌に分けられるが、付着細菌は動植物やデトライトスなどの固形物の表面に付着して増殖し、細菌のバイオフィルムを形成している。海藻表面にはビブリオおよびビブリオ拮抗細菌を含めた細菌群が海水中と比較して相対的に多かったものと考えられる。

[質問 2] ビブリオおよびビブリオ拮抗細菌は海藻に直接影響を及ぼさないと考えられるが、なぜ拮抗細菌が海藻に多く分布しているのか？

[回答 2] 固形物の表面には有機物や栄養物質が濃縮されており、細菌は栄養濃度の高い固形物表面に付着してフィルム状に増殖する。海藻付着細菌として種々の細菌が分布するが、その中でビブリオ属菌に抗菌性を示す細菌が沿岸海水や飼育水中よりも高頻度で検出されたものと考えられる。

[質問 3] 抗菌活性を示す AVS-03a、c、d の 3 成分が検出され、a と d の化学構造が決定されたが、c についての情報は得られたのか？

[回答 3] AVS-03c について MS および NMR のデータが得られていないので正確な化学構造は不明である。しかし、UV 吸収スペクトル（吸収極大 315、327 nm）を測定しており、a、d のそれと非常に近似していることから alkyl-quinolinol 化合物の 1 種ではないかと推定される。

[質問 4] AVS-03c の MS および NMR はどうして測定しなかったのか？

[回答 4] AVS-03c の収量が少なかったので本実験では測定できなかった。

[質問 5] 抗菌物質の安定性について、特に低 pH 域（pH 2~3）で抗菌活性が低下しているがこのような条件で抗菌物質が分解するのか？

[回答 5] 低 pH 域ではプロトン濃度が高くなり、quinoline 環に結合している OH 基や二重結合が構造的な影響を受けたのではないかと考えられる。

[質問 6] pH の実験では緩衝液を使用したのか？ また pH 処理後に抗菌活性を測定す

る時には pH の調整はどうしたのか？

[回答 6] pH 処理後に抗菌物質を酢酸エチルで抽出し、得られた抗菌物質を pH 7.0 の緩衝液に溶解させてから抗菌活性を希釈法によって測定した。抗菌物質を添加していない緩衝液についても対照実験を行っている。

[質問 7] 初期の実験で A1-J10 株の方が A1-J11 株よりも抗菌活性が高かったが、その後はなぜ A1-J11 株を供試するようになったのか？

[回答 7] 最初 A1-J10 株の方が抗菌活性が高かったので、主として A1-J10 株について実験を進めて行く予定であったが、ある時期から突然、J10 株の抗菌物質の生産がほとんど消失してまった。そこで J10 株に性状が近似していた J11 株を主要な供試菌株とした。J10 株については何回か継代培養しているうちに抗菌物質非生産株と交代したのではないかと考えられる。

[質問 8] 得られた抗菌物質を実際のエビ養殖に使用することが考えられるのか？ またその場合にエビや他の水生動物に毒性はないのか？

[回答 8] 水産養殖における応用は非常に興味があるが、これまで検討はしていない。pentyl-quinolinol が単細胞藻類に対して増殖阻害作用があることから、USA の大学で海水中の藻類防除に応用したという報告がある。水生動物に対する影響はあまり考えられないが藻類や水生植物に対する影響を考慮する必要がある。しかし実際には抗菌物質の直接的な応用よりも細菌のプロバイオテックスとしての応用の方が可能性があると考えている。

[質問 9] 拮抗細菌のスクリーニングにおいて、主として色素産生菌をターゲットにしたのは何か理由があるのか？

[回答 9] 海洋細菌の中で *Pseudomonas* 属菌は抗菌物質や生理活性物質を産生するものが多いという報告があり、また同時に色素産生菌が多い。色素産生菌はコロニーの識別が容易で扱い易いので色素産生菌株を一次的なターゲットとした。