

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏名 小谷真也

指導教官名 村上昌弘

論文題目 Studies on antialgal compounds of algicidal bacteria

(殺藻細菌の産生する抗藻物質に関する研究)

夏場湖沼において形成されるアオコは、主に藍藻類の異常増殖によって引き起こされ、肝臓毒やカビ臭を産生することで環境上問題となっている。凝集剤などを用いたアオコの制御に関する試みは 1950 年代から取り組まれているが、より環境に負荷の少ない防除方法として拮抗微生物を用いた方法が注目を浴びている。藍藻に対する拮抗微生物にはアメーバ、細菌、カビ、シアノファージなどに関して多数報告があるが、特に藍藻を溶解する細菌に関しては、その殺藻特異性の広さから環境への応用が期待されている。これまでの研究で殺藻細菌のバイオマスと湖沼中の植物プランクトン量は密接な関係があり、殺藻細菌がアオコの消滅に関与していることが明らかとなっている。現在までに、アオコの防除を目的として殺藻細菌の殺藻機構を解明する試みが多数行われている。その中で、プロテアーゼ、グルコシダーゼなどの酵素類、 β -ラクタム系の抗生物質などが殺藻に関与していると推定されているが、抗藻物質の単離、構造決定に関しては、研究報告が少ないのが現状である。このような背景のもとに、本研究では、藍藻の発生の顕著な湖沼から殺藻細菌を単離し、殺藻細菌の培養液および菌体から抗藻物質の単離、同定を行った。

1. 殺藻細菌のスクリーニング

殺藻細菌のスクリーニングに関しては 2 つの方法を用いた。第一の方法として、1999 年の 3 月から 5 月にかけて、藍藻の発生の顕著な千葉県手賀沼および東京都上野不忍池において表層水のサンプリングをおこなった。その後、表層水からワックスマン培地を用いて 64 株の細菌を単離した。それぞれの菌株を 5 mL の液体培地で 3 日間培養したのちに、15 mL の MeOH を加え抽出した。得られた抽出液を濃縮後、藍藻 *Anabaena cylindrica* (NIES-19) に対する抗藍藻アッセイ（ペーパーディスク法）に付した。その結果、活性が見られたのは M1 株と命名した株 1 株のみであった。第二の方法として、2000 年 1 月から 10 月まで上野不忍池および九段下皇居外堀において表層水のサンプリングを行った。サンプリングした表層水約 100 μ L を 0.5% カシトン CB 寒天培地に塗布し、5 日間 25 $^{\circ}$ C でインキュベートした。出現してきたコロニーを *A. cylindrica* を含む CB 寒天培地上に白金耳を用いてそれぞれ接種した。その後、5 日間インキュベートし、プラーク形成能の有無により抗藍藻活性を判断した。その結果、14 株の殺藻細菌を得ることが出来た。また、2001 年 3 月中にワックスマン培地を用いて上野不忍池表層水および底泥から、同様の方法により 15 株の殺藻細菌を単離した。

2. 16S rDNA による殺藻細菌の同定

得られた殺藻細菌 30 株に対してコロニー PCR 法を行った。PCR のプライマーに関しては大腸菌の 16S rDNA から細菌間でよく保存されている領域を用いてデザインした。すなわち、5'末端の 8 番目から 27 番目までの塩基配列 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')、3'末端の 1510 番目から 1492 番目までの塩基配列 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') の 2 つのプライマーを用いた。殺藻細菌 30 株の内 16 株については、ほぼ全長 1.5 kbp を DNA シーケンサーを用いて解析した。また、残りの 14 株についても約 500 bp の部分配列の解析を行った。その結果、30 株の内、15 株が *Pseudomonas* 属、8 株が *Bacillus* 属、3 株が *Arthrobacter* 属、2 株が *Streptomyces* 属に含まれる細菌であることが明らかとなった。また、残りの 2 株の内、1 株が *Cytophaga-Flavobacterium* group に含まれる細菌で、もう 1 株が *Paenibacillus* 属に近い細菌であることが明らかとなった。

3. 二次スクリーニング

得られた殺藻細菌 30 株に関して二次スクリーニングを行った。すなわち、それぞれの菌株を 500 mL の液体培地で培養し、MeOH 抽出後、H₂O/EtOAc を用いた二

層分配を行い、脂溶性画分および水溶性画分に分画した。それぞれ得られた画分をペーパーディスクを用いた抗藍藻試験に付したところ、脂溶性画分では、*Pseudomonas* 属の細菌から 5 株、*Bacillus* 属の細菌全てに活性が見られた。また、*Paenibacillus* sp. S4 株は水溶性、脂溶性ともに抗藍藻活性を示した。

4. *Pseudomonas* sp. K44-1 株の産生する抗藍藻物質の単離と同定

二次スクリーニングで脂溶性画分に活性の見られた *Pseudomonas* sp. K44-1 株について 0.5%カシトン CB 培地で大量培養を行った。得られた全培養液を超音波処理によって細胞を破碎した後に EtOAc で抽出を行った。その結果、20 L の全培養液から 1.52 g の粗抽出物を得た。EtOAc 粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させ、順次 CH_2Cl_2 、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1)、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2)、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:4) の溶媒系で溶出した結果、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1)の画分に抗藍藻活性が見られた。活性画分を ODS を用いた逆相 HPLC で分取することにより、活性成分である harmane (1-methyl- β -carboline)を 2.1 mg 得ることが出来た。harmane の同定については ^1H NMR および HRFABMS、 ^1H - ^1H COSY、HMBC、HMQC、NOESY を含む各種二次元 NMR の解析により行った。harmane および標品の norharmane (β -carboline)はともに *A. cylindrica* および *Microcystis aeruginosa* に対して、30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示した。

5. *Bacillus* sp. M1 株の殺藻活性と産生する抗藍藻物質の同定

Bacillus sp. M1 株を *A. cylindrica* を含む寒天培地上に接種した結果、強いプラーク形成能を示した。そこで、二者培養実験を行うため 7 日間前培養しておいた *A. cylindrica* の液体培養液に対して 10^4 から 10^7 cells/mL の細胞密度で M1 株を接種した。その結果、M1 株は 10^5 から 10^7 cells/mL の接種濃度で、殺藻活性を示すことが明らかとなった。抗藍藻物質を得ることを目的として、M1 株をワックスマン培地で大量培養し、菌体を遠心分離により回収した。乾燥菌体 9.8 g に対して 2 L の 80% MeOH で三回抽出を行った後、2 L の MeOH で抽出を行った。80%MeOH と MeOH 抽出物を合一後、ODS カラムクロマトグラフィーに付し、20%MeOH、50%MeOH、70%MeOH、MeOH の含水系溶媒で順に溶出した。活性の見られた MeOH 画分に関して、ODS を用いた逆相 HPLC による分取を行い、活性物質である surfactin を 22.8 mg 得ることが出来た。surfactin の同定は、アミノ酸分析、各種 NMR の測定、HRFABMS の測定によって行った。HRFABMS の測定により分子式は、 $\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}$ と決定された。surfactin の加水分解物をアミノ酸分析に付したところ、4 モルの Leu、1 モルの Val、Glu、および Asp

を検出した。さらに 0.5%の無水 TFA を含む DMSO- d_6 中で ^1H NMR を測定した結果、 β -ヒドロキシ脂肪酸の存在が示唆された。 ^1H - ^1H COSY、HMBC、HMQC、NOESY を含む各種二次元 NMR の測定を行ったところ各ユニットの配列が決定され、1968 年に *Bacillus subtilis* より単離された抗生物質 surfactin の構造と一致することが明らかとなった。surfactin は、藍藻類 *A. cylindrica*、*Oscillatoria agardhii*、*M. aeruginosa*、*M. viridis* に対して、30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示した。一方緑藻類 *Chlorella vulgaris* と *Chlamydomonas tetragama* に対しては 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示さなかった。surfactin はグラム陰性菌外膜に対して作用することが知られており、藍藻類もグラム陰性菌に近い膜構造を持つことから、その特異的な活性が説明できると考えられた。

6. *Paenibacillus* sp. S4 株の産生する抗藍藻物質の単離と同定

二次スクリーニングで脂溶性および水溶性画分に活性の見られた *Paenibacillus* sp. S4 株について、ワックスマン寒天培地上で固体培養を行った。5 L の培養寒天を凍結乾燥後、粉末状にし、2 L の MeOH で 3 回抽出を行った。MeOH 抽出物を減圧濃縮後、 $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}$ で二層分配を行い、さらに活性の見られた H_2O 画分を等量の *n*-BuOH で抽出した。得られた *n*-BuOH 画分を ODS カラムクロマトグラフィーに付し、順次 20%MeOH、40%MeOH、60%MeOH、80%MeOH、MeOH の含水系の溶媒で溶出した。活性の見られた 80%MeOH 画分から、ODS を用いた逆相 HPLC により既知化合物である permetin A および YM-28160 をそれぞれ 3.5 および 4.4 mg 得ることが出来た。permetin A および YM-28160 の同定は surfactin の同定と同様にして加水分解物のアミノ酸分析、HRFABMS、各種 NMR スペクトルデータの解析によって行った。permetin A および YM-28160 は藍藻類 *A. cylindrica*、*O. agardhii*、*M. aeruginosa*、*M. viridis* に対して、30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示した。一方緑藻類 *C. vulgaris* と *C. tetragama* に対しては 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示さなかった。

以上のように殺藻活性を持つ *Pseudomonas* 属の細菌、*Bacillus* 属、および *Paenibacillus* 属の細菌から、4 種類の抗藍藻物質を得ることが出来た。これらの細菌は環境水中に広く存在することが知られており、菌自体が藍藻の防除に対して有効なのはもとより、本研究によりその産生する物質が有効である可能性が示された。