

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小谷真也

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が行われているが、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。しかしながら、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、殺藻細菌から抗藻物質の単離、同定を行った。

まず、殺藻細菌のスクリーニングを行った。第一の方法として、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。培養菌体を MeOH で抽出し、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 1 株のみであった。第二の方法として、サンプリングした表層水約 100 μ L を 0.5% カントン CB 寒天培地に塗布し、5 日間 25 $^{\circ}$ C でインキュベートし、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、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、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。

このようにして得られた殺藻細菌 30 株に対してコロニー PCR 法を行った。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。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。

次に、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 MeOH 抽出後、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。

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% カントン CB 培地で大量培養を行った。菌体を EtOAc で抽出し、各種クロマトグラフィーにより殺藻物質を単離し、機器分析の結果、活性物質を *harmane* と同定した。*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 µg/disk で活性を示した。

Bacillus sp. M1 株は *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。さらに大量培養菌体を MeOH で抽出し、各種クロマトグラフィーにより分画した結果、活性物質として 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。その結果、*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、*A. cylindrica*、*Oscillatoria agardhii*、*M. aeruginosa*、*M. viridis* に対して、30 µg/disk で活性を示した。

最後に、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。MeOH 抽出物を減圧濃縮後、各種クロマトグラフィーにより permethrin 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。Permethrin A および YM-28160 は *A. cylindrica*、*O. agardhii*、*M. aeruginosa*、*M. viridis* に対して、30 µg/disk で活性を示した。

以上のように本論文は、抗藍藻活性を指標とした幅広いスクリーニングの結果、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単離・構造決定した。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ものであり、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。