

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 13 年度博士課程 入学
氏 名 鄭 盛允
指導教官名 阿部宏喜

論文題目 Studies on Algicidal Compounds from the Marine Bacteria
against the Harmful Dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*
(有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* に対する
海洋細菌由来の殺藻物質に関する研究)

魚介類の養殖は世界的に広く行われているが、時として赤潮発生により、多大な被害をうけることで世界的な社会問題となっている。韓国でも赤潮による養殖魚介類に対する被害が多数報告され、中でも渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* は韓国各地で赤潮を形成し、養殖魚介類の大量斃死を引き起こしているが、同時に現場海域では海洋細菌によると推測される *C. polykrikoides* の消滅も観測されている。近年、殺藻活性を持つ海洋細菌を微生物農薬として赤潮防除に利用する方法が注目されており、この方法は海洋生態系に及ぼす影響が少なく、二次汚染のない環境にやさしい赤潮防除方法と考えられる。海洋細菌による赤潮の消滅は、細菌より分泌される殺藻物質によると推測されているが、今までに単離・構造決定された殺藻物質は高度不飽和脂肪酸を除いては無く、その殺藻メカニズムに関する知見も少ない。

以上のような背景に基づき、本論文では *C. polykrikoides* の赤潮発生海域から、同種に対する

殺藻活性を示す細菌を分離し、殺藻物質の単離・構造決定を行った。さらに、殺藻物質について殺藻活性を明らかにするとともに、他の海洋生物に及ぼす影響について検討した。その概要は以下の通りである。

1. 殺藻細菌のスクリーニング

韓国 Masan 湾の *C. polykrikoides* 赤潮発生海域において、1年を通じて Microplate MPN 法を用いて殺藻細菌のスクリーニングを行った。*C. polykrikoides* は9月に特に優先種として出現し、10月には消滅したのに対し、*C. polykrikoides* に対する殺藻細菌の数は9月に最も増え 4.8×10^3 cells/ml (前月の約30倍) となり、赤潮が消滅する10月に 2.0×10^2 cells/ml まで減少した。したがって、9月に赤潮発生海域から得られる殺藻細菌が *C. polykrikoides* の赤潮の消長に関与するものと考え、主として9月に現場海域において殺藻細菌の株の分離を行った結果、110株の殺藻細菌を得ることができた。

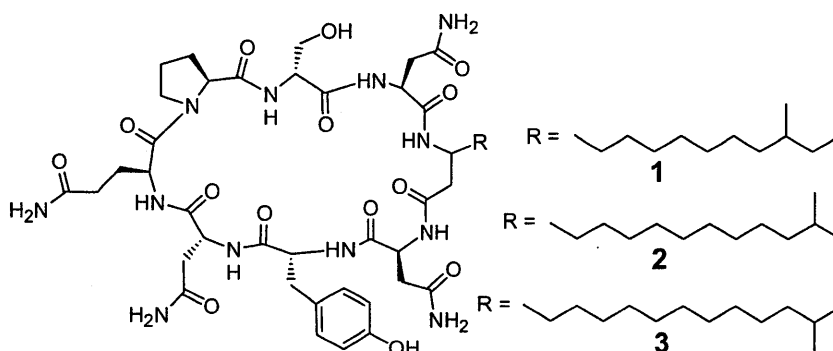
2. 16S rDNA 塩基配列分析による殺藻細菌の系統分類

Microplate MPN 法を用いた殺藻細菌のスクリーニングにより得られた110株の殺藻細菌のうち、強い殺藻活性を示した20株を選択し、16S rDNA 塩基配列による系統分類を行った。その結果、殺藻細菌は主に Firmicutes、Actinobacteria および γ -Proteobacteria の3グループに属することが明らかになった。また、*C. polykrikoides* に対し最も強い殺藻活性を示した菌株は *Bacillus subtilis* と非常に近縁であったため、*Bacillus* sp. SY-1 株と命名した。

3. *Bacillus* sp. SY-1 由来の殺藻物質 mycosubtilin 類の構造決定および海洋生物に及ぼす影響

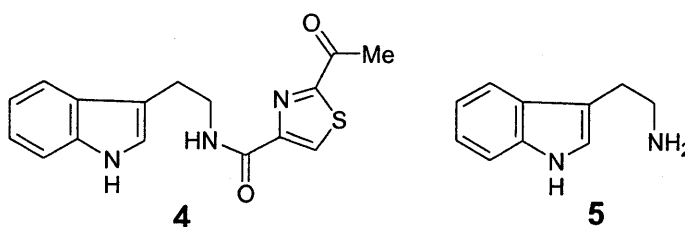
Bacillus sp. SY-1 の培養ろ液より、溶媒分画、ODS カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により、*C. polykrikoides* に対する殺藻活性を指標に殺藻物質の精製を行い、mycosubtilin 類 (1-3) を得ることができた。化合物 1-3 の分子式は HR-FABMS 解析より、それぞれ $C_{49}H_{76}N_{12}O_{14}$ 、 $C_{50}H_{78}N_{12}O_{14}$ 、 $C_{51}H_{80}N_{12}O_{14}$ と決定され、平面構造はアミノ酸分析の他、各種2次元 NMR スペクトルの解析により決定された。構成アミノ酸の絶対立体の決定は、Marfey 法およびキラル GC 分析により行い、各々1 mol の D-Tyr、D-Asn、L-Gln、L-Pro、D-Ser および2 mol の L-Asn で構成されることが判明した。化合物 2 および 3 は既知の mycosubtilin 類であったが、1 は新規物質であり、その分子量に基づいて MS 1056 (1)、MS 1070 (2)、MS 1084 (3) と命名した。1-3 は *C. polykrikoides* に対してそれぞれ $LC_{50} = 2.3, 0.8$ および $0.6 \mu\text{g/ml}$ と極めて強力な殺藻活性を示した。この他、6種の渦鞭毛藻と2種のラフィド藻に対しても強い殺藻活性を示した。また、最も強い活性を示した MS 1084 (3) の有害赤潮生物以外の生物に対する増殖阻害活性を調べた結果、2種のカビと2種の酵母に対しては強い活性を、藍藻 *Microcystis aeruginosa* と

Synechococcus sp.には弱い活性を示したが、6種の細菌および4種の緑藻には全く活性を示さなかった。



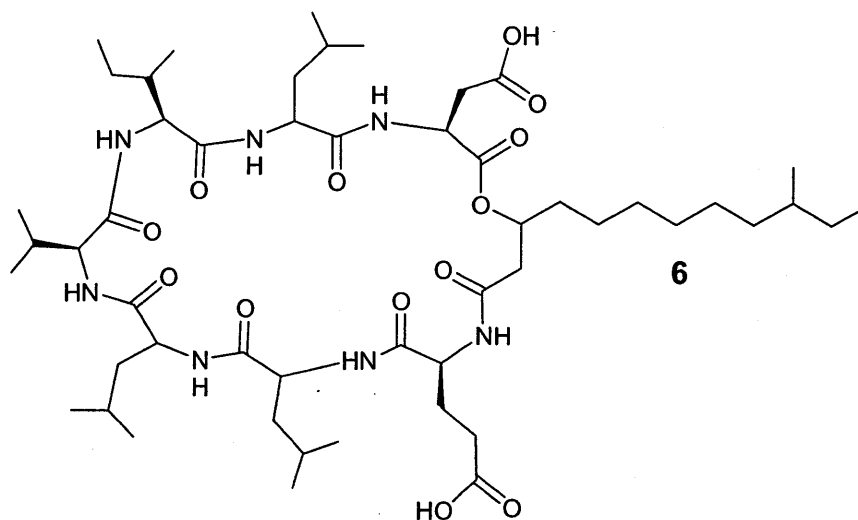
4. *Bacillus* sp. SY-1 および *Dietzia* sp. SY-2 由来の殺藻物質 bacillamide と tryptamine の単離、構造決定および海洋生物に及ぼす影響

Bacillus sp. SY-1 の培養ろ液より、mycosubtilin 類とは異なる殺藻物質として bacillamide (4) および tryptamine (5) を単離した。4 の分子式は HR-FABMS 解析より $C_{16}H_{15}N_3O_2S$ と決定され、 1H - ^{15}N HMBC 法を含む各種 2 次元 NMR 解析から、4 はチアゾール環を含む新規トリプタミン誘導体であり、その平面構造は 4 と決定された。Bacillamide と tryptamine の *C. polykrikoides* に対する殺藻活性はそれぞれ $LC_{50} = 3.2$ および $12.7 \mu g/ml$ であった。また 4 は殺藻細菌 *Dietzia* sp. SY-2 から単離することができた。インドールアルカロイドは自然界に広く存在し、抗生物質として知られているものが多いことから、4、5 およびその類縁体である tryptophan と serotonin の赤潮生物に対する殺藻活性を検討した。4、5 は渦鞭毛藻とラフィド藻に対して強い殺藻活性を示したが、tryptophan と serotonin は赤潮生物に対してほとんど活性を示さなかった。また 4 について、赤潮生物以外の海洋生物に対する影響を調べた結果、緑藻、藍藻、珪藻、細菌、カビ、酵母に対しては $50 \mu g/ml$ まで全く増殖阻害活性を示さなかった。



5. *Dietzia* sp. SY-2 由来の新規殺藻物質[Ile5, Asp7] surfactin の構造決定および海洋生物に及ぼす影響

殺藻細菌 *Dietzia* sp. SY-2 の培養ろ液から、溶媒分画、ODS カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC を用い、*C. polykrikoides* に対し殺藻活性を示す新規環状ペプチド[Ile5, Asp7] surfactin (6) を単離し、その構造決定を行った。6 の分子式は HR-FABMS 解析より $C_{51}H_{89}N_7O_{13}$ と決定され、平面構造はアミノ酸分析、各種 2 次元 NMR スペクトルの解析により 6 と決定された。Marfey 法により 6 は、1 mol の L-Glu、L-Leu、L-Val、L-Ile、L-Asp および 2 mol の D-Leu で構成されることが判明し、各アミノ酸残基の結合様式を HMBC と NOESY 相関により決定したが、D-、L-Leu の帰属は未決定である。6 は既知の surfactin と比べ二つのアミノ酸が異なる新規物質である。*C. polykrikoides* に対して 6 は $LC_{50} = 6.2 \mu\text{g/ml}$ の殺藻活性を示した。また 6 は赤潮生物以外の生物には顕著な増殖阻害活性を示さなかった。



以上、渦鞭毛藻 *C. polykrikoides* の赤潮発生海域から分離され、この渦鞭毛藻の赤潮消長に関与すると考えられる海洋細菌から新規化合物を含む 6 つの殺藻物質を単離し、それらの構造を明らかにすることが出来た。これらの物質は *C. polykrikoides* 以外の赤潮藻に対しても選択的な殺藻活性を示したものの、赤潮藻以外の海洋生物に対してはほとんど活性を示さなかった。このことは天然物化学、赤潮藻の生態・生理学の観点からみて非常に興味深い結果であると同時に、安全で環境にやさしい赤潮駆除法の開発を目指す上での重要な知見となり得ると考えられる。