

氏 名	上 野 雄 介
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1071 号
学位授与の日付	平 成 11 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 水 産 学 専 攻
学位論文題目	高濃度有機物による偏性低栄養海洋細菌の死滅機構に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 内 田 有 恒 教 授 中 原 紘 之 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

一般に海洋では、直接検鏡により計数される細菌のうち、通常細菌の分離培養に用いられる高濃度ペプトン寒天培地(5g ペプトン/L)で分離・培養可能なものは、0.1%以下である。本研究では、環境中の多くの細菌が通常の高濃度ペプトン培地でなぜ培養不可能なのかを明らかにすることを目的として、低濃度有機物培地を用いて分離した偏性低栄養海洋細菌の高濃度有機物培地における増殖阻害機構の解明をおこなった。内容は以下のとおりである。

第一章では、これまでの研究の背景として、海洋では直接検鏡により計数される細菌のうち、通常細菌の分離培養に用いられる高濃度ペプトン寒天培地(5g ペプトン/L)で分離・培養可能なものは、0.1%以下であり、50%以上の細菌は生理活性を持つが分離・培養できない細菌(VBNC細菌)であることを述べている。またこのようなVBNC細菌の生理・生態を明らかにするためには、培養法を工夫することによりVBNC細菌を分離・培養してその諸性質を研究する必要があることを述べている。

第二章では、低濃度有機物液体培地を用いて分離された16SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列より系統的に新奇な細菌と判明している偏性低栄養海洋細菌5株を用い、通常のパプトン培地中(ST培地:5g ペプトン/L)の増殖阻害因子を検討した結果を述べている。ペプトンの主要成分である、アラニンをはじめとする数種のアミノ酸を個々に高濃度(200mgC/L)添加した培地中においてのみ、偏性低栄養海洋細菌はST培地中と同様に増殖阻害を示したことから、ST培地中における偏性低栄養海洋細菌の死滅をともなう増殖阻害はこれらのアミノ酸により引き起こされていると結論づけている。

第三章では、加えた有機物の代謝産物による培地のpHの変化や加えた有機物によるフィードバック阻害が、高濃度有機物添加による細菌の増殖阻害である可能性について検討した結果を述べている。高濃度アミノ酸添加培地で偏性低栄養海洋細菌KI89A株を培養した後の培養液のpHには変化は認められず、細菌細胞内の有機酸の蓄積も認められなかったことから、高濃度アミノ酸による増殖阻害はアミノ酸の代謝産物によるpHの変化によるものではないと結論づけている。また、KI89A株の増殖を阻害する200mgC/Lのアラニンを添加した培地にさらに他の基質を添加することによっても、KI89A株の増殖阻害は抑制されなかったことから、増殖阻害が添加した高濃度有機物による生合成系のフィードバック阻害に由来するとは考えにくいと結論づけている。

第四章では、偏性低栄養海洋細菌KI89A株を用い、高濃度アラニンによる死滅過程について検討した結果を述べている。20mgC/L以上のアラニン存在下で基質として与えた他のアミノ酸の取り込みは阻害され、しかも増殖阻害効果のある高濃度(2gC/L)アラニン存在下においても、アラニンは細胞内に取り込まれ、アラニンとして多量に蓄積していたことから、高濃度アラニン存在下においては、細胞内のアミノ酸プールにインバランスが生じていることを明らかにした。また、高濃度(2gC/L)アラニン存在下におけるKI89A株の種々の生理活性の変化を経時的に調べた結果、高濃度アラニン存在下で10~24時間培養することにより、溶菌は認められなかったものの、DNA合成活性、タンパク質合成活性および呼吸活性は、それぞれ培養前の活性の1/10以下にまで減少したが、増殖能は、種々の生理活性が低下した高濃度アラニン存在下での培養7日間は減少しないことを明らかにした。さらに、KI89A株は高濃度(2gC/L)アラニン存在下において形態が短

桿状から球状へ変化し、ペリプラズム空間と思われる領域が拡大し、細胞質が収縮していることも明らかにした。

第五章では、総括として、偏性低栄養海洋細菌 KI 89 A 株は、高濃度アラニン存在下では多量の遊離のアラニンが細胞内に蓄積し、1 日以内に細胞膜に傷害が生じるとともに、DNA 合成、タンパク質合成および呼吸活性がすみやかに低下すること、その過程において細菌細胞の細胞質が収縮し、増殖に必須なタンパク質の合成も阻害されること、アラニン添加後 1～7 日間は、細胞に傷害が生じているものの増殖能は維持され、その後、細胞に傷害が蓄積することにより徐々に死滅に向かうと結論づけた。

論文審査の結果の要旨

海洋環境中には、生理活性は有するが、高濃度有機物培地を用いては分離・培養が不可能な細菌（VBNC 細菌）が多く存在している。本研究では、海洋から低濃度有機物液体培地を用いて分離した、高濃度有機物培地では増殖不可能な細菌（偏性低栄養海洋細菌）の高濃度有機物培地での増殖阻害機構について検討したものである。本研究の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 偏性低栄養海洋細菌 5 株を用い、高濃度有機物の増殖阻害因子を検討した結果、ペプトンの主要成分である、アラニンをはじめとする 10 種類のアミノ酸を高濃度（200 mgC/L）に添加した培地中において、ST 培地中と同様に増殖阻害を示したことから、ST 培地中における偏性低栄養海洋細菌の増殖阻害はこのようなアミノ酸により引き起こされている可能性が大きいことを明らかにした。また、ST 培地中および高濃度アミノ酸添加培地中における増殖阻害は細胞の死滅を伴ったものであることを初めて明らかにした。

2. 偏性低栄養海洋細菌 KI 89 A 株の高濃度（2 gC/L）アラニンによる増殖阻害（死滅）は、これまでに報告されている、添加した有機物の代謝産物による培地の pH の変化や、添加した有機物による代謝系のフィードバック阻害による増殖阻害機構とは異なった増殖阻害機構である可能性を明らかにした。

3. 偏性低栄養海洋細菌 KI 89 A 株を用い、高濃度アラニンによる死滅過程について検討した結果、高濃度アラニン存在下においては、細胞内に高濃度のアラニンが蓄積してアミノ酸プールにインバランスが生じていることを明らかにした。また、高濃度（2 gC/L）アラニン存在下における KI 89 A 株の種々の生理活性の変化を経時的に調べた結果、高濃度アラニン存在下で 10～24 時間培養することにより、溶菌は認められなかったものの、DNA 合成活性、タンパク質合成活性および呼吸活性は、それぞれ培養前の活性の 1/10 以下にまで減少したが、増殖能は、種々の生理活性が低下した高濃度アラニン存在下での培養 7 日後も維持されていることを明らかにした。

4. KI 89 A 株は高濃度（2 gC/L）アラニン存在下において形態が短桿状から球状へ変化し、ペリプラズム空間と思われる領域が拡大し、細胞質が収縮していることを電子顕微鏡を用いて明らかにした。

5. 偏性低栄養海洋細菌 KI 89 A 株は、高濃度アラニン存在下では遊離のアラニンが細胞内に蓄積し、1 日以内に細胞膜に傷害が生じるとともに、DNA 合成、タンパク質合成および呼吸活性がすみやかに低下し、同時に細菌細胞の細胞質が収縮し、増殖に必須なタンパク質の合成も阻害されることから、アラニン添加後 1～7 日間は細胞に傷害が生じているものの増殖能は維持され、その後傷害が蓄積することにより徐々に増殖能を失うという死滅機構を提唱した。

以上のように、本論文は環境中の VBNC 細菌である偏性低栄養海洋細菌が高濃度有機物培地において増殖阻害を受けるのは、高濃度有機物が細菌細胞内に蓄積して、細菌細胞内の有機物プール中でのインバランスが生じることに始まる一連の代謝阻害によるものであることを明らかにしており、海洋分子微生物学、微生物生態学、および微生物生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 4 月 20 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。