



Title	Studies on the effects of plant secondary metabolites on bacterial developments for xenobiotic biodegradation, biofilm formation and production of biocontrol agent [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金, 東燁
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11105号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53966
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Dongyeop_Kim_review.pdf, 「審査の要旨」



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学)

氏 名 Dongyeop Kim

審査担当者	主査	教授	橋床泰之
	副査	教授	生方 信
	副査	教授	Han Gi Dong (韓国, 嶺南大)
	副査	准教授	橋本 誠
	副査	講師	崎浜靖子

学位論文題名

Studies on the effects of plant secondary metabolites on bacterial developments for xenobiotic biodegradation, biofilm formation and production of biocontrol agent
(細菌による生体異物分解, バイオフィルム形成, ならびに他者制御物質生産に対する植物二次代謝産物の効果に関する研究)

本論文は本文 185 ページ, appendix とリストを含めた総ページ数 202, 図 63, 表 8, スキーム 1, 6 章からなり, 272 本の文献を引用し, 参考文献として4本が付されている. 内容は以下のとおりである.

1. ピロガロール基を保有する植物ポリフェノール類の共代謝効果による *Burkholderia unamae* CK43B 分離株での効率的な含窒素芳香族化合物分解

インドール核は, 含窒素芳香族化合物(HNAC)の基本骨格のひとつであり, これらは生体異物としても自然界に広く存在する. 本研究では, ポリフェノールに富んだ泥炭土壌適応フタバガキ根圏から含窒素芳香族化合物(NHAC)分解能をもつ根圏細菌として分離した *Burkholderia unamae* CK43B 株を用い, 震盪培養条件下, 窒素源をインドールに限定した培地でのインドール分解の効率性を調べた. 培地にピロガロール基を有する植物由来ポリフェノール類, 例えばタンニン酸, 没食子酸, ピロガロール, ならびに(-)-エピガロカテキン, をそれぞれ添加したところ, このインドール核中の窒素原子を窒素源として利用できる本細菌のインドール分解反応が亢進することを見出した. この分離株は, インドール核のピロール環を開裂後, アントラニル酸を生成し, 引き続いての中間体の脱炭酸に共役した酸化的アミノ基脱離反応により, カテコールを生成した. この, 植物ポリフェノール共代謝効果による *B. unamae* CK43B のインドール分解亢進は, この細菌の棲息環境に起因する植物ポリフェノール・リッチかつ窒素欠乏環境に対する適応戦略獲得の結果であると推定した. この様な細菌をタンニン含有植物の根に定着させ, HNAC に汚染された土壌のファイト-バイオレメディエーション技術へ活用する提案がなされている.

2. インドールと没食子酸が介在するインドール分解細菌 *B. unamae* CK43B のバイオフィルム形成とインドール生成

多くの微生物において, インドールとその誘導体はバイオフィルム形成のための細胞シグナル分子として機能する. 一方, *B. unamae* CK43B 株は静置培養では添加インドールを 3-hydroxyindoxyl へ変換する. *B. unamae* CK43B の純粋培養系および *E. coli* との共培養

系における、インドール添加のバイオフィルム形成への効果を調べたところ、過剰量（1.7 mM）のインドールを添加した培地で静置培養した *B. unamae* CK43B は、自身がインドールから変換する 3-hydroxyindoxyl のために菌体生育が阻害された。これに対し、ポリフェノールをさらに添加した静置培養では、没食子酸（1.0 mM）のみが *B. unamae* CK43B 株による初期のインドール酸化を強く阻害した。さらに、*B. unamae* CK43B と *E. coli* K-12 の共培養系に 1.0 mM 没食子酸を添加した場合、バイオフィルム中で両菌体の混合体の形成が認められた。これらの結果は、没食子酸存在下で残存するインドールが、インドール産生 γ プロテオバクテリアとインドール分解菌間の異種間コミュニケーションを担うことを示唆していた。

E. coli K-12 の細胞外シグナル分子には AI-2 とインドールが存在し、これらのシグナル物質が *E. coli* のバイオフィルム形成に重要な役割を果たしていることが知られている。AI-2 生合成に直接関わる LuxS 遺伝子を保有する野生型 *E. coli* 株では、*B. unamae* CK43B 株との共培養で誘導される混合系バイオフィルム形成は培養液中の残存インドール濃度に正の相関を示した。*E. coli* LuxS 遺伝子欠損変異体では AI-2 抑制がかからないため、没食子酸添加なしでバイオフィルム形成誘導が認められた。*E. coli* の LuxS 遺伝子欠損変異体と *B. unamae* CK43B 株との共培養では、没食子酸が含まれない培地で形成されるバイオフィルム様のスライム内で両菌体が均一に混ざり合うことを FISH 法を用いて示した。このことから、互いの異なるプロテオバクテリア二者の協調性を保つバイオフィルムの形成に、インドールが重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. オカラに含まれ、*Bacillus amyloliquefaciens* によるイツリンをはじめとする抗菌性環状ペプチドの産生を促進させる生理活性物質の追跡

食品残渣であるオカラは、バチルス属細菌の抗菌性ペプチド産生を亢進する活性があることが知られている。本研究室で分離した *Bacillus amyloliquefaciens* を用い、本細菌が産生する環状抗菌性リボペプチドのフザリウム属真菌に対する抗菌活性を指標に、オカラに含まれる抗菌活性ペプチド産生亢進物質の探索と単離精製を試みた。オカラ抽出物自体、あるいはオカラ抽出物を添加していない培地で培養した *B. amyloliquefaciens* の培養濾液は、*Fusarium oxysporum* 分生子の発芽を全く阻害しなかったが、オカラ抽出物を添加した培地での培養液は、被検菌の分生子発芽を強く抑制した。この現象は、*B. amyloliquefaciens* による抗菌性ペプチドの生成自体の亢進が、オカラ由来活性成分の添加によってもたらされることを明らかにした。その活性を指標に抗菌活性量の増大をもたらす化合物を追跡した結果、活性本体として 700 Da 以上の分子量をもつアラビノガラクトサン結合ペプチド様化合物と推定される水溶性化合物を得た。オカラから得られたこの活性化合物は、*B. amyloliquefaciens* の増殖を加速させ、バチルス芽胞形成を誘導し、かつ抗菌性ペプチド総生成量を高めた。

以上、本研究では主にバイオフィルム形成と抗菌性ペプチド産生を指標として、植物由来の普遍的な二次代謝産物（ポリフェノール類やアラビノガラクトサン類）が細菌の機能性に大きく影響を及ぼす例を幾つか見出し、その機構について解明するに至った。以上の成果は、植物の代謝産物によるバイオフィルム形成を含む菌体分化制御技術の進展に、大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、キム ドンギョプが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。