HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Sphingopyxis属GF9株が生産する異種微生物増殖因子に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	髙井, 亮吾
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13597号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74337
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryogo_Takai_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　髙　井　亮　吾

審査担当者　主　査　教　授　松　浦　英　幸
副　査　客員教授　鎌　形　洋　一
副　査　名誉教授　生　方　信
副　査　講　師　重　冨　顕　吾

学 位 論 文 題 名

Sphingopyxis 属 GF9 株が生産する異種微生物増殖因子に関する研究

本論文は和文 90 頁、図 43、表 17、3 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

地球上に存在する微生物種のうち、99%以上は実験室条件において培養が不可能な難培養微生物とされる。難培養微生物が実験室条件において増殖しない原因の一つとして、環境中で他種から供給される増殖因子が実験室条件において再現されていないことが挙げられる。著者の所属する研究室では活性汚泥より見出された *Sphingopyxis* sp. GF9 株と、GF9 株が産生する異なる化合物によって増殖刺激を受ける 3 種の細菌類、*Leucobacter* sp. ASN212 株、*Catellibacterim nectariphilum* AST4 株及び *Bosea minatitlanensis* 近縁種である ASTN45 株について研究を進めてきた。このうち ASN212 株が要求する増殖因子は coproporphyrin（Cop.）類であることが先行研究において明らかにされている。本学位論文では第一に、ASTN45 株ならびに AST4 株に対する増殖因子の解明について検討している。また、第二に ASN212 株の増殖因子である Cop.類の作用機序解明と、Cop. III が Actinobacteria 及び Firmicutes を中心とした細菌類の増殖に与える影響について検討している。

1. *B. minatitlanensis* 近縁種 ASTN45 株並びに *C. nectariphilum* AST4 株に対する増殖因子の探索

GF9 株培養上清より、各種クロマトグラフィーを用いて ASTN45 株ならびに AST4 株に対する増殖因子の精製を行い、最終的に ASTN45 株に対しては 0.4 μg/mL、AST4 に対しては 35 ng/mL で活性を示す画分の取得を達成した。ASTN45 株に対する活性画分 0.9 mg に対して NMR による構造解析を試みたが、なお夾雑物を含むことを示唆する煩雑なスペクトルを得ている。また、AST4 株に対する活性画分には His-Pro 環状ジペプチドが主として含まれていたが、これは増殖活性を示さなかった。以上の結果により、2 種類の微生物増殖因子が極めて

強力な活性を有することが示された。

2. Cop. III 金属錯体を用いた構造活性相関研究及び作用機序の解明

Cop. I 及び Cop. III に対して各種金属錯体の調製を検討した。その結果 Zn 及び Cu が室温条件での錯体形成を示す一方、Fe、Cu、Co 及び Ni は 100 ^{o}C の加温条件においてのみ錯体を形成することを明らかにした。また、調製した金属錯体に対して増殖活性評価を行った結果、Zn 及び Fe の金属錯体が増殖活性を示すこと、Cop. III 金属錯体は Cop. I の金属錯体と比較してより高い活性を示すことを見出した。さらに著者は ASN212 株の heme 生合成遺伝子の解析を行い、ASN212 株の HemB、HemC、HemE 及び HemY について機能の欠損があることを見出した。これらの結果から、Cop. 類がシグナル物質としてよりむしろ、ASN212 株を含む Actinobacteria 及び Firmicutes に特異的な heme 生合成における生合成中間体として増殖促進活性を示していることが明らかにされた。

3. Cop. III が細菌叢に与える影響

Cop. III 添加条件で培養を行った各種細菌叢から DNA を抽出し、Actinobacteria 及び Firmicutes 特異的プライマーを用いた PCR によって門レベルでの増殖評価を行った。その結果、Cop. III の添加条件においてこれら細菌群に対する増殖抑制が観察された。また、Actinobacteria 及び Firmicutes を中心とした 7 種の細菌株に対して増殖活性評価を行った結果、Cop. III が ASN212 株の近縁種である *Leucobacter komagatae* を含む 2 種に対して増殖を促進することを明らかにした。*L. komagatae* の heme 生合成経路解析の結果から、ASN212 株と同様に heme 生合成経路の機能の欠損が予想されたため、本菌株も ASN212 株同様の機構で増殖刺激を受けたと考えられる。一方で、他の 5 種に対しては増殖抑制が認められた。Cop. III は光照射によって、活性酸素種を生成することが報告されている。このことから Cop. III は増殖活性と活性酸素生成による増殖阻害といった 2 面的な作用によって細菌叢に影響を与えると結論している。

以上、本研究により、異種微生物間に於ける増殖因子の授受が、多く場合で極めて低濃度で達成されていることが明らかにされた。また、新規増殖因子 Cop.類の作用機序の解明は、heme 生合成経路が欠損した難培養微生物の培養法の確立および、環境中における微生物間相互作用の解明の一助となるものである。本研究で得られた成果により、今後 Cop. III を用いた新たな難培養微生物の培養法の確立が期待される。よって、審査員一同は、髙井亮吾氏が博士（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。