

学位論文題名

海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生する

抗ウイルス物質に関する研究

学位論文内容の要旨

魚類の増養殖事業現場において、健康種苗の確保および管理、感染症の防除は不可欠な課題であるにも関わらず、毎年種々の疾病が発生し、深刻な打撃を受けている。特にウイルス感染症は、その伝播が細菌その他による感染症に比べて極めて速く、しかも有効な治療薬もないことから、一度ウイルス病が発生すると、多大な被害を被る場合が多い。従って、ウイルス病の効果的な防疫法が強く望まれている。そこで本研究は、水圏由来細菌が産生する抗ウイルス物質を魚類ウイルス性疾病の予防・治療対策に有効利用することを考え、そのための基礎的知見を得ることを目的とした。

まず第1章では、Kameiら(1987c, 1988b)が分離し、サケ・マス類の代表的な病原ウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に対し、抗ウイルス活性を示す水圏由来細菌125菌株のうち、強い抗IHNV活性を有する63菌株を供試して、それぞれの産生する抗IHNV物質の作用特性に基づく型別を行った。得られた結果は、水圏由来細菌の産生する抗ウイルス物質に関するこれまでの報告の多

くがウイルスレセプターのブロックやウイルス粒子の酵素的分解などウイルスに対する直接作用であるとしていることを支持するとともに、ウイルスの増殖段階を阻害する物質や作用の異なる複数の物質を産生する細菌も存在することが新たな知見として得られた。またこのような物質を産生する細菌は分類上 *Pseudomonas* 属や *Vibrio* 属の細菌とする報告があるが、海水環境由来菌株では両属細菌の他 *Moraxella* 属も多数存在すること、さらに上記63菌株より代表4菌株を選び、それぞれが産生する抗IHNV物質の諸性状の検討結果、水圏由来の細菌が産生する抗ウイルス物質は多様であることが明らかとなった。

第2章では第1章の結果から高分子で易熱性の抗IHNV物質を産生することが示唆された海洋細菌 *Alteromonas* sp. 48HS-27株を供試し、まず抗ウイルス物質産生条件の検討を行った。その結果、25℃で72～96時間振盪培養するのが最適であった。次にこの条件下で培養した上清から抗IHNV物質の精製を試み、限外濾過、硫酸塩析、アセトン沈澱、ゲル濾過および分取電気泳動などにより、精製度270倍、最終収率6.20%で精製抗IHNV物質48HS-27Aを得た。次に精製48HS-27Aを用いて魚類株化細胞に対する細胞毒性を調べるとともに、各種魚類病原ウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した。その結果、48HS-27Aの魚類株化細胞に対する最小毒性濃度は144 $\mu$ g/mlであったのに対し、魚類病原ウイルスOMV、HRV、IHNV、SVCV、PFRおよびEVAに対する50%感染阻止濃度(IC<sub>50</sub>)は0.09～2.51 $\mu$ g/mlと低く、48HS-27Aは低細胞毒性でかつこれらのウイルスに

強い抗ウイルス活性を有することが証明された。本物質は既知の抗ウイルス剤と比較しても極めて強い活性を有していた。さらに本物質は、カゼインおよびウシ血清アルブミンに対し分解活性を有するプロテアーゼであること、ヒト腫瘍細胞であるKB細胞およびマウス白血病白血球細胞であるL1210細胞に対し、弱い抗腫瘍活性が認められることなどを明らかにした。次に48HS-27Aの酵素学的性状を検討した。まずpHおよび熱安定性について調べたところ、48HS-27Aは1°C、3時間の条件下でpH3.0~11.0の範囲でほぼ安定であったが、熱に対しては不安定であった。分子量約52,000の48HS-27A(pI 5.1)は20°C以上で15分間加熱することにより、48HS-27Aの二量体と考えられる分子量約98,000の熱変性酵素(48HS-27B;pI 5.1)を生じ、さらに温度を上げて50°Cで15分間加熱することにより単量体で分子量約45,000の熱変性酵素(48HS-27C; pI 5.2)へと不可逆的に変化した。48HS-27Aのプロテアーゼ活性に対し賦活化作用を示す塩類は塩化ナトリウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムで至適濃度はそれぞれ500 mM、80 mMおよび8 mMであった。これら塩類の賦活化作用は、マグネシウムおよびカルシウムが分子内金属としてプロテアーゼ活性に関与し、ナトリウムが酵素の安定化に関与していることが推定された。次に基質特異性を検討したところ、抗ウイルス活性を有する48HS-27Aは、合成基質中のチロシン(Tyr)のC末端側およびフェニルアラニン(Phe)のC末端側を切断したが、抗ウイルス活性を失った48HS-27Bおよび48HS-27Cは、TyrのC末端側のみを切断し、

PheのC末端側を切断できなかつた。このことからPheのC末端側を切断し得るか否かが、抗ウイルス活性の有無を決定している可能性が示唆された。反応至適条件は48HS-27Aが15°CでpH 11.0、48HS-27Bが45°CでpH 9.0、48HS-27Cが60°CでpH 8.5であつた。至適条件下において、48HS-27AのSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAに対する $K_m$ は0.049mM、 $k_o$ は99sec<sup>-1</sup>で、同酵素のSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAに対する $K_m$ は0.47mM、 $k_o$ は88sec<sup>-1</sup>であつた。また、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAに対する48HS-27Bの $K_m$ は0.14mM、 $k_o$ は71sec<sup>-1</sup>で、同基質に対する48HS-27Cの $K_m$ は0.13mM、 $k_o$ は57sec<sup>-1</sup>であつた。またキモスタチンおよびSTIは本酵素活性を阻害すること、PheおよびTyrのC末端側を切断することなどからキモトリプシン類似のセリンプロテアーゼである可能性が考えられたが、本酵素は分子量、等電点および至適pHなどで既報のキモトリプシンA、BおよびCとは明らかに性状が異なることから、新種の酵素である可能性が高い。さらに抗ウイルス性プロテアーゼ48HS-27Aの抗ウイルス作用機序を検討した結果、48HS-27Aは魚類病原ラブドウイルスであるIHNV、HRV、EVAおよびEVEXの構造タンパクを分解し、これらのウイルスを直接不活化していることが確認された。これまでに、水圏におけるウイルスの不活化に関与する細菌由来の物質として報告されているものは各種の分解酵素など高分子で易熱性の物質がほとんどであるが、実際にそのような物質を精製した例はなく、まして酵素学的性状を明らかにしたのは初めてである。

最後に第3章では、*Pseudomonas* sp. 51BBW-29株および *Alteromonas* sp. 48HS-27株の産生する抗IHNV物質を多量に得ることを目的に、両菌株を固定化したアルギン酸カルシウムビーズを用いたバイオリアクター・システムを考案し、これを用いて抗ウイルス物質の生産を実験室レベルで試みた。菌体固定化ビーズを電子顕微鏡観察したところ、細菌はビーズ表面でよく増殖し、供試ビーズ中の *Pseudomonas* sp. 51BBW-29株および *Alteromonas* sp. 48HS-27株の生菌数は $10^9 \sim 10^{10}$  CFU/Beadに達した。さらに両菌株の抗ウイルス物質生産量の最高値は、69.3  $\Delta$  IHD<sub>50</sub> (14~17日目)および46.7  $\Delta$  IHD<sub>50</sub> (11~14日目)で、従来の振盪培養法に比べ2.5および2.7倍上昇した。本バイオリアクター・システムは、ビーズの活性化に5日間を要したが、その後は振盪培養法における最高値以上の生産量が連続15日間(5~20日目)にわたり継続した。

以上のごとく本研究では、水圏由来の細菌が産生する抗ウイルス物質のうち、多くの研究者が指摘しているタンパク分解酵素の一つを精製し、その性状を明らかにし得たと考える。さらに本物質は抗ウイルス剤として優れた性質を持つのみならず酵素としても特異な性状を持つことから、今後は魚類ウイルス病の制御に対する利用が期待されるとともに、酵素としての利用法も検討する必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男  
副 査 教 授 信 濃 晴 雄  
副 査 助 教 授 田 島 研 一  
副 査 講 師 吉 水 守

学 位 論 文 題 名

## 海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生する 抗ウイルス物質に関する研究

魚類の増養殖事業に多大な被害を与えているウイルス性疾病には、現時点では有効な治療法がないことから、早急な予防・治療対策の確立が望まれている。本論文は水圏由来細菌の産生する抗ウイルス物質に着目し、それを有効利用するための基礎的知見を得ることを目的として、海洋細菌の産生する抗ウイルス物質の単離・精製、生化学的性質の解明および抗ウイルス作用機序を検討したものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. 淡水、汽水、海水試料から分離された細菌のうち強い抗ウイルス活性を示す63菌株を供試して、これらの産生する抗ウイルス物質の作用様式に基づく型別を行った。その結果、52菌株はウイルス粒子に直接作用する物質を産生し、10菌株がウイルス増殖段階を阻害する物質を産生し、1菌株は両方の作用を有する物質を産生することを明らかにした。さらに代表菌株を選び、それぞれの産生する物質の耐熱性と分子量の推定を試み、これらの菌の産生する物質が多種にわたることを確認した。
2. 上記の代表菌株中から、易熱性で高分子の物質を産生する *Alteromonas*

sp.48HS-27株を選び、本菌株の産生する抗ウイルス物質の単離・精製を試み、培養上清から限外濾過、硫酸およびアセトン沈澱、ゲル濾過、分取電気泳動により最終収率6.2%で精製抗ウイルス物質48HS-27Aを得た。

3. 48HS-27A は、エンベロープを有する魚類病原ウイルスの OMV, HRV, IHNV, SVCV, PFR および EVA に対する 50% 感染阻止濃度が  $0.09 \sim 2.51 \mu\text{g/ml}$  と強い抗ウイルス活性を示し、一方、魚類培養細胞に対する最小毒性濃度は、 $144 \mu\text{g/ml}$  と低毒性であることを明らかにした。

4. 48HS-27A は、分子量  $52\text{kDa}$  のプロテアーゼであり、広範な pH 域で安定であるが熱には不安定な物質で、その酵素活性は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  により著しく賦活化されることを示した。

5. 48HS-27A は、 $25^\circ\text{C}$  の加熱でも変性し、変性中間物質 (48HS-27B) となり、さらに  $50^\circ\text{C}$  の加熱で分子量  $47\text{kDa}$  の変性物質 (48HS-27C) へと変化した。これら A, B, C は、いずれもプロテアーゼ活性を有するが、A のみが抗ウイルス活性を保持していることを明らかにした。

6. 48HS-27A, B, C は、いずれもプロテアーゼ用合成基質のうち -Tyr-C 末端側を切断し、同基質での反応至適条件は、A が pH11.0 で  $15^\circ\text{C}$ 、B が pH9.0 で  $45^\circ\text{C}$ 、C が pH8.5 で  $60^\circ\text{C}$  と異なり、いずれもキモスタチンと STI により阻害されることなどから、アルカリ性セリンプロテアーゼ系の新種の酵素であることを示唆した。

7. 48HS-27A のみが -Pro-Phe- を認識し、その -Phe-C 末端側を切断することを見だし、この基質特異性が 48HS-27A の抗ウイルス作用に直接関与していることを示唆した。

8. 抗ウイルス性プロテアーゼ 48HS-27A の抗ウイルス作用機序を検討し、IHNV をはじめとする 4 種類の魚類病原ラドウイルスの構造タンパクを分解するこ

とから、48HS-27Aがウイルス粒子に直接作用して不活化することを明らかにした。

9. Alteromonas sp.48HS-27 株と Pseudomonas sp. 51BBW-29 株の生菌をアルギン酸ビーズに固定化したバイオリクターシステムを用い、それらの抗ウイルス物質の産生条件を検討した。その結果、固定化ビーズの活性化に5日間を要するが、その後は、約15日間にわたり液体培地で振盪培養する方法に比べ約2.5~2.7倍の生産量が得られた。これにより抗ウイルス物質を安価で簡便に量産できることを示した。

以上、本論文では、これまで多くの研究者が指摘しながらその本体の解明がなされなかった水圏でのウイルス不活化因子で、細菌由来のタンパク分解酵素の一つとして、海洋細菌 Alteromonas sp.の産生する抗ウイルス性プロテアーゼを単離し、酵素化学的性質を明らかにし、その抗ウイルス作用機序を解明した。

また、本物質は抗ウイルス剤として優れた性質を持つのみならず、酵素として特異な性質を持つことが示された。さらに、本物質が安価で簡便に量産する方法も考案されたことから、今後、魚類ウイルス病の防除に対する有効利用が期待される。

以上の成果は水圏における魚類病原ウイルスの微生物制御の可能性を示唆し魚類病原微生物学に新しい知見を加えるのみならず、水産学に貢献するところ大であり、審査員一同は、本論文が博士（水産学）の学位論文として十分な業績と判定した。