

学 位 論 文 題 名

深海魚の腸管由来好圧細菌の培養と
その脂質特性に関する研究

学位論文内容の要旨

好圧細菌は、大気圧下よりも加圧下で良好に増殖するという特性により定義され、高水圧で低水温の深海環境に適応した細菌群であり、深海の物質循環などに大きな役割を果たしていると考えられる。このような好圧細菌は、大気圧下の生物にとっては極限環境である深海で活発に増殖することから、環境適応のために特殊な代謝系や生理機能を有していることが予想され、学術的にも産業的にも強い関心が持たれている。特に、低温と高圧はともに、生体膜の主成分である脂質の流動性を低下させ、膜機能に阻害的に働くと考えられることから、深海に適応した好圧細菌は脂質構成やその圧力適応機序に何らかの特殊性を有していることが予想される。しかし、試料採取や培養が困難なことから、その生理、生態に関する報告は非常に少なく、環境適応の機序を解明するに至っていない。

そこで、本研究ではこれまで好圧細菌の分離が報告されていない深海魚の腸内容物を試料として、好圧細菌の培養を試み、新たに考案した方法により純粋分離を行った。さらに、純粋分離した好圧細菌の脂質構成の特性を検討するとともに、圧力変化に伴う脂質構成の応答変化を検討した。

第1章では、まず、非保圧、非保温で採取し、加圧して持ち帰った深海魚の腸管試料について、加圧下で増殖する細菌群の探索を行った。その結果、19試料中5試料で細菌の増殖が観察されたが、14試料では増殖が見られず、試料採取過程での減圧や昇温による死滅などの可能性が考えられた。そこで、試料採取直後に、大気圧下での平板法および加圧下での最確数（MPN）法による生菌数と直接法による総菌数との比率を検討した。その結果、いずれの試料においても加圧培養下での生菌数が

多かった。なお、加圧培養下での菌の増殖の有無は腸内容物中の菌量に左右され、試料によっては総菌数の45%が培養可能であった。このことから、試料培養までの減圧や昇温にも関わらず、多くの好圧細菌が生残していたことが示され、また、深海魚腸管内細菌群集のかなりの部分を好圧細菌群が占めていると考えられた。次いで、新たに考案した方法により、高圧下での純粋分離を行い、得られた純粋分離菌株のうち21菌株について圧力特性を検討したところ、15菌株が偏性好圧細菌、6菌株が通性好圧細菌であった。このことから、本法により偏性および通性好圧細菌を効率よく純粋分離することが可能であり、また深海魚腸管中には様々な圧力特性をもつ好圧細菌群が存在することが明らかとなった。

第2章では、まず、純粋分離した好圧細菌の代表株について、リン脂質組成と脂肪酸組成を検討した。好圧性菌株のリン脂質組成は、いずれの菌株でもホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルグリセロール (PG) が主で、一般的な細菌の組成と同様であった。しかし、脂肪酸組成は、好圧性菌株の場合、一般の細菌では稀な高度不飽和脂肪酸 (PUFA) のエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) あるいはドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6n-3) のいずれかを含んでいたが、耐圧性菌株ではどちらも検出されなかった。次に、深海魚腸管および浅海性動物腸管におけるPUFA合成細菌の存在とその量について検討した。深海魚腸管中には、生菌数と同程度のPUFA合成細菌が存在し、PUFA合成細菌が総菌数の30%に達する試料もあった。一方、浅海性動物6種10試料から分離した計112菌株では、DHAを合成する菌株は認められなかった。これらのことからDHA合成細菌は相対的に深海魚に偏在しており、好圧細菌の深海環境への適応にDHAが何らかの役割を果たしていると考えられた。一方、EPA合成は、浅海性動物試料由来の56菌株中40菌株に見られ、その分布と現場の温度や圧力などの要因との関連性は見いだされず、EPA合成細菌の種類と分布の多様性が伺われた。

そこで、第3章では、PUFA合成好圧細菌の脂質構成を検討し、それにおよぼす培養圧力の影響を検討した。EPA合成好圧細菌代表株33E1およびT3602では、総脂肪酸中のEPAの比率 (%) は大気圧培養菌体に比べ加圧培養菌体で高かった。また、PE、

PGともに大気圧培養菌体に比べ加圧培養菌体では、飽和脂肪酸とモノ不飽和脂肪酸が少なく、EPAが多かった。この変化は、*E. coli*（大腸菌）の低温適応に類似していることから、EPAの役割のひとつは脂質流動性の維持と考えられた。DHA合成好圧細菌代表株16C1のリン脂質は、PEでは、モノ不飽和脂肪酸が多く、DHAは数%であったのに対し、PGではDHAが30%近く含まれていた。総脂肪酸中のDHAの比率（%）は、大気圧培養菌体に比べ加圧培養菌体で明らかに高く、また大気圧下では、より低温で培養した菌体でDHAが相対的に多くなったことから、DHAが好圧細菌の圧力および温度適応に関与していることが示唆された。さらに、リン脂質の分子種分析を行ったところ、大気圧培養菌体に比べて、加圧培養菌体では、PEでモノ不飽和脂肪酸／モノ不飽和脂肪酸分子種が多く、PGではモノ不飽和／モノ不飽和分子種とモノ不飽和／PUFA分子種が多かった。これらの不飽和／不飽和分子種の増加は、*E. coli*の低温適応において観察されることから、DHAの役割のひとつは、このような分子種の形成を通じ、膜脂質流動性を維持することと考えられた。ただ、DHAを含む分子種の物理特性については不明な点があり、また*E. coli*などでは、PGがDNA複製やタンパク質分泌などの機能に強く関わっているとされていることから、菌株16C1でDHAがPGに偏在していたことは、DHAが膜流動性以外の他の重要な機能に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

第4章では、深海魚腸管由来好圧細菌の代表3菌株について属レベルの同定を行った。DHA合成好圧細菌の菌株16C1は、*Vibrio*属と考えられた。一方、EPA合成好圧細菌の菌株33E1およびT3602はともに、*Alteromonas*属と考えられたが、その分類学的位置の確定には、より詳細な検討が課題として残された。

以上、非保圧、非保温の試料採集方法で採取した深海魚腸管から、偏性好圧細菌を含む様々な圧力特性を有する好圧細菌を分離し得た。供試した好圧細菌は、いずれもPUFAを合成し、EPA合成好圧細菌およびDHA合成好圧細菌ともに加圧下の培養でPUFAの含有量が増大したことから、それらが高圧環境への適応に関わっていることが示された。また、脂肪酸組成あるいは分子種組成と培養圧力の関係から、EPAやDHAが膜脂質の流動性維持に大きな役割を担うとともに、DHAはPGに固有の機能

と関連し、圧力適応に関わっている可能性が示唆された。

今後、PUFA合成好圧細菌の分子種組成を含めたより詳細な検討を行い、その圧力適応現象の解明を行う必要があると考える。また、単細胞の原核生物におけるDHAの機能を明らかにするために、生合成系制御に関する検討を行う必要があると考えている。

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	教 授	高 橋 是太郎
副 査	助教授	田 島 研 一
副 査	助教授	吉 水 守

学 位 論 文 題 名

深海魚の腸管由来好圧細菌の培養と その脂質特性に関する研究

低温・高水圧の深海環境に適応した好圧細菌は、特殊な形質、機能を有している可能性があり、貴重な遺伝子源として学術的にも産業的にも注目されている。しかし、好圧細菌を分離培養するには、試料採取時の昇温、減圧を防ぐ試料採取装置と加圧培養に耐え得る特殊な純粋分離用培地が必要とされている。それゆえ、好圧細菌は、分離培養が困難で、これまでに分離された好圧細菌は、わずか30菌株足らずであり、その実態解明にはほど遠い状態にある。本研究は、好圧細菌の分離源として水深3,000～6,000 mに棲息する深海魚の腸内細菌に着目し、非保温、非保圧状態で試料魚を採取し、好圧細菌の培養法に工夫を加え、分離した好圧細菌の脂質特性を検討して、圧力適応機序について考察したものである。特に評価される成果は、以下のとおりである。

1. 5種46尾の深海魚を供試し、採捕直後に船上で腸管を摘出し、保存することなく直ちに腸内容物を培地に接種し、供試魚採捕現場と同じ低温・高圧下で培養することにより、好圧細菌を効率よく培養できることを明らかにした。さらに、大気圧下および加圧下で培養する最確数(MPN)法による生菌数の測定結果から、深海魚腸内容物の細菌群中に占める好圧細菌群の割合が高いことを明らかにした。

2. 新たに考案した方法(ドラヤキ法)により特殊な培地を使用せずに、通常の培地で好圧細菌の純粋分離が可能であることを示し、本法により深海魚腸内容物から様々な圧力特性をもつ偏性および通性好圧細菌の分離に成功した。

3. 純粋分離した好圧細菌代表菌株の脂質構成を検討し、リン脂質としてはホスファチジルエタノールアミン(PE)とホスファチジルグリセロール(PG)が主成分であること、脂肪酸組成では一般の細菌では稀な高度不飽和酸(PUFA)のエイコサペ

ンタエン酸(EPA)かあるいはドコサヘキサエン酸(DHA)のいずれかを高率に含有することを明らかにした。

4. 深海魚と浅海性魚介類の腸管内におけるPUFA合成細菌の分布・存在状態を比較検討した結果、深海魚腸管内ではPUFA合成細菌が生菌数の大部分を占め、一方、浅海性魚介類腸管内からは、DHA合成細菌が全く検出されず、EPAを高率に含有する細菌が主に冷水性の試料から比較的多く検出される傾向を認めた。

5. 培養圧力に伴う好圧細菌の膜脂質構成の変動を詳細に検討した結果、EPA合成好圧細菌では、加圧下で総脂肪酸、EP、PGともEPAの占める割合が明らかに高くなった。一方、DHA合成細菌では、加圧によりPEでモノ不飽和酸の増加が顕著であるのに対し、PGではDHAが急増した。これらの結果から、不飽和脂肪酸、特にPUFAが好圧細菌の深海適応現象に重要な役割を果たしていることを示唆した。

6. DHA合成好圧細菌の有するリン脂質の分子種分析の結果から、大気圧下に比べ加圧下において、PEでモノ不飽和酸／モノ不飽和酸分子種が明らかに多くなり、PGでは、モノ不飽和酸／モノ不飽和酸分子種とモノ不飽和酸／PUFA分子種が増加することを明らかにし、これらの変化が高圧下での膜脂質の流動性維持に関連したものと考察した。

7. 加圧培養したDHA合成好圧細菌でPGのDHA含有率が急増するが、PGでのDHA結合位置がsn-2位に偏在することを明らかにし、この事実から、DHAが膜流動性維持以外に他の重要な圧力適応機能にも関与している可能性を示唆した。

8. 深海魚腸管由来のDHA合成好圧細菌の代表株1株とEPA合成好圧細菌代表株2株について属レベルの同定を試みた。その結果、DHA合成好圧細菌1株を*Vibrio*属に、EPA合成好圧細菌2株を*Alteromonas*属に同定した。

以上、本論文では、独創的な手法により、深海魚腸管内に様々な圧力特性を有する好圧細菌が存在することを明らかにするとともに、それらを効率よく純粋分離することに成功した。さらに、好圧細菌の膜脂質構成と圧力適応との関連性に着目して脂質構成を詳細に解明し、好圧細菌の圧力適応機序の解明に大きな示唆を与える成果を得た。

これらの成果は、海洋微生物学の発展に大きく寄与するのみならず、好圧細菌の分離培養を容易にし、幾つかの特性を明らかにしたことから、本菌の有用形質、機能の開発・利用に途を拓くものであり、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内容を有するものであると判定した。