

(第6号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ngo Vy Thao
審査委員	主査 鈴木 聡 副査 北村 真一 副査 中島 敏幸

### 論文名

Collaborative processing of proteins by bacteria and protists in marine microbial loop

(海水中の微生物連鎖系における細菌と原生生物の共同的タンパク質分解過程)

### 審査結果の要旨

海洋生態系での物質循環では、生物どうしの捕食食物連鎖のほかに、溶存態有機物を細菌類が利用して粒子態有機物に変換する過程を起点とするマイクロビアルループが重要な機構となる。これまでに、生物体に由来するタンパク質が生態系で再利用される場合は、細菌類が高分子を低分子に分解して利用すると信じられて来た。しかし、愛媛大学 CMES のグループは、海洋現場観測の結果から、細菌のみならず、微生物相互作用によるタンパク質分解を示唆する研究成果を得つつあった。本研究はこの仮説を実験的に証明したものである。

Ngo Vy Thao は、まず、細菌とその捕食者の共存効果を明らかにした。Thao は 50  $\mu\text{m}$  ネットで濾過して動物プランクトンを排除した海水マイクロコズム系を構築した。このなかには、細菌とその捕食者である原生生物が含まれる。さらに、原生生物を排除し、細菌を含む系 (0.7  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過)、および細菌の多くをも除去した系 (0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過) を準備した。対象区はオートクレーブ処理した海水区である。この中に、世界の広い海域で普遍的に検出される溶存態タンパク質の起源細菌である緑膿菌 (Pa) を滅菌したものを基質として加え、経時的にプロテアーゼ活性と、Pa タンパク質の分解変化を調べた。その結果、原生生物を排除し、細菌を含む系でタンパク質分解酵素活性がもっとも高くなった。原生生物を含む系では酵素活性はあまり高くはならなかった。これは捕食者のいない系では細菌が活性化することを示している。しかし、基質の分解結果では、原生生物が共存する系では 15 日間ですべてのタンパク質が分解されたが、細菌のみの系では 15 日後でも基質タンパク質は残存し、細菌細胞も除去した系では 1 ヶ月後でもタンパク質は残存した。酵素活性の高さには一致しない結果であった。このことは、細菌由来の酵素だけではタンパク質の完全分解はおこらず、原生生物の共存が完全分解に必要であることを示す結果であっ

た。

次に、原生生物の酵素活性とタンパク質分解を調べた。Thao は海水から新規に原生生物を単離培養し、オートクレーブ海水を用いて限定的構成生物を含むマイクロコズムを構築した。原生生物は、18S rRNA 遺伝子の全長解析から繊毛虫 *Paranophrys marina* であることが分かった。この繊毛虫には共存細菌 *Roseobacter* sp. が付随しており、マイクロコズムではその細菌の影響も考慮できる系を準備した。結果的にはこの共存細菌自体はタンパク質分解にあまり関与していないことが分かった。結果は基質 Pa 濃度を変化させた系でも確認した。海水中の酵素活性は、細胞外酵素と細胞アソシエイト酵素に分画して測定した。その結果、繊毛虫共存細菌はほとんど酵素を産生せず、繊毛虫自体が細胞外へおもにトリプシン型プロテアーゼを産生していた。一方、ロイシンアミノプチダーゼは細胞アソシエイト型の活性が高かった。この結果は、繊毛虫がトリプシン型酵素を細胞外へ産生して高分子タンパク質をオリゴペプチドへ分解し、アミノペプチダーゼでアミノ酸を切り出すという分解過程を経ることで基質タンパク質が完全分解されることを示唆している。細菌のみでは高分子からオリゴサイズへの変換が遅く、そのため高分子タンパク質が残存すると考えられる。繊毛虫はトリプシン型酵素を細胞外へ産生することで、細菌が利用しやすい分子量への変換を促進することが分かった。

これまでは、海洋の有機物変遷の研究では、バルクの試料を炭素・窒素元素まで還元して定量してマスバランスを明らかにする、あるいはオーム解析で網羅的に残存有機物の種類を決める、という手法での研究が主であり、酵素活性と分解物の変遷を追跡した研究はなかった。加えて、同定された微生物を用いてモデル生態系で解析した例はなく、本研究は酵素・細胞・群集レベルの実験で微生物海洋学に新たな進展をもたらしたと言える。

本研究を通して、これまで明らかにされていなかった、「海洋微生物ループでのタンパク質分解過程は、細菌と原生生物に由来する酵素の共同的作用によって進む。両者は被捕食者と捕食者の関係だけではなく、原生生物が細菌の利用しやすい有機物生産を手助けしている」という新しい図式が実験的に解明された。これは初めて得られた知見であり、本研究は生物海洋学、微生物生態学の分野における国際的情報を拡大した。海洋での生物由来有機物の分解・循環過程の解明は、基礎生態学における評価だけでなく、環境科学的にも評価できるものである。

以上のような研究内容の評価により、審査委員全員一致して本学位論文が、博士(理学)を授与するに値する論文であると判定した。

本論文の内容は平成 27 年 8 月 3 日の公聴会において、約 40 分の口頭発表と引き続き 20 分間の質疑応答として発表された。