【学位論文審査の要旨】

１　研究の目的

自然環境中で、細菌は多種が共存し、微小な生態系を形成している。そこでは、共存する他種と相互に影響を及ぼしあっている。これまでの微生物学では、細菌を純粋分離してその性質を知ることに注力してきたが、自然界での細菌の生き方を知るためには、細菌間相互作用を理解することが重要である。本論文では、好熱性の緑色糸状性光合成細菌を対象に、その細胞運動に注目して、種間相互作用を介した細菌の新たな生存戦略の解明を目的とした。

細菌の代表的な生存戦略に細胞運動が知られる。細菌は、細胞外環境を感知して運動により、劣悪環境から逃避したり、好適環境に集合したりする。細菌間の相互作用には、競争、協同などが古くから知られており、これらの種間相互作用が細菌の運動性に影響を与えることは強く予想される。しかし、そのような視点で研究された例はない。

研究対象として用いた緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* は広く陸上温泉に分布する好熱性細菌で、一次生産者として、多種細菌が共存する微生物生態系を支えている。この光合成細菌は、細胞が連結して糸状体を形成しており、固体表面の上を直線的に滑るように動く「滑走運動」を示す。また、細胞密度が高まると糸状体同士の表面を滑走運動し、方向転換を繰り返すことで、細胞集塊を形成する。これら滑走運動やそれに基づく集塊形成は、他菌と共存する自然環境中でも進行している。

本論文は、これまで捉えられてこなかった微生物生態系における種間相互作用を介した動的な細菌の挙動を明らかにするものである。

２　研究の方法と結果

（１）他細菌による糸状性光合成細菌の細胞凝集促進作用

野外を流れる温泉流水中で糸状性光合成細菌と共存している従属栄養細菌を分離し、それらが糸状性光合成細菌の細胞凝集性に与える影響を評価した。分離株の培養上清を糸状性光合成細菌の細胞懸濁液に添加して、細胞凝集体形成速度を測定した結果、5 株の分離株の培養上清に、凝集体形成速度の促進作用を見出すことができた。

最も顕著な促進作用が見られた *Bacillus* 属細菌（*Bacillus licheniformis* に近縁）について、その作用機構を解析し、熱処理で促進作用が抑制されたこと、分子量 10kDa 以上の画分に活性が見られたことから、タンパク質であると予想した。培養上清にプロテアーゼ活性が検出され、セリンプロテアーゼに対する阻害剤を添加すると、促進作用は大きく低下したことから、培養上清に含まれるプロテアーゼが作用していると考えられた。このことは、*B. licheniformis* 由来の精製プロテアーゼを用いて確認している。

プロテアーゼ処理によって糸状性光合成細菌の細胞から遊離する物質を、限外ろ過およびゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、凝集形成促進因子が分子量約 3,000 の画分にあることを示した。

（２）糸状性光合成細菌のプロテアーゼからの逃避運動

本論文で分離したプロテアーゼ生産菌は、糸状性光合成細菌を溶菌し炭素源として生育することが示され、これは細菌間での捕食－被食関係と考えられた。これらの結果を受けて、糸状性光合成細菌の滑走運動によるプロテアーゼからの逃避行動の可能性を検証した。

試験管の底から、寒天培地、糸状性光合成細菌を懸濁した寒天培地、プロテアーゼを含む寒天培地、の順に重層して、光照射条件で培養した。分光学的に試験管内の細胞分布を定量した結果、時間経過に伴って、糸状性光合成細菌の細胞がプロテアーゼ層から離れるように移動することを明らかにした。

糸状性光合成細菌の糸状体細胞の動きが、プロテアーゼによって変化する様子を顕微鏡観察した。プロテアーゼ添加によって、細胞の運動速度に有意な変化は見られず、運動の方向転換頻度が高くなることを見出した。糸状体の細胞がプロテアーゼを感知した時、運動の向きを転換し、低濃度側に移動すると転換頻度を低下させ、高濃度側に移動したときは転換頻度を上げて、低濃度側に移動する機会を高めていると考えられた。

以上のように、プロテアーゼという忌避物質からの逃避運動を細胞集団レベルで示すだけでなく、その運動への影響を細胞レベルで示すことができた。

本論文では、これらの成果を二つの章に分けて関連論文を引用しながら明確に記述するとともに、新規性、意義や今後の展望を総合的に論じている。

３　審査の結果

本論文では、溶菌酵素であるプロテアーゼが、細菌の運動性を促進するという新たな細菌間相互作用を発見した。また、その作用はプロテアーゼ処理によって糸状性光合成細菌から遊離する低分子物質によるものであることを示した。さらに、プロテアーゼ生産菌が糸状性光合成細菌の細胞を溶菌・捕食するのに対し、糸状性光合成細菌は、プロテアーゼを感知し、プロテアーゼ生産菌から逃避することを明らかにした。このような細菌界における捕食からの逃避行動は、初めての発見である。プロテアーゼは、広く細菌から検出される酵素であることから、その感知および応答に関する本論文の発見は、微生物の生態学および生理学において大きな意義を持つ。本論文の内容の一部は、すでに英文学術雑誌に審査のうえ受理されており、残りの部分も、今後公表されるに十分値する内容を含んでいる。よって、本論文は博士（理学）の学位に十分値すると判定した。

４　最終試験の結果

本学の学位規則および生命科学専攻内の申し合わせに従って最終試験を行った。公開の席上で論文内容を発表し、生命科学専攻教員による質疑応答をもって論文内容および関連分野についての最終試験とし、合格と判定した。