

学位論文要旨

氏名 澄川 佳奈

題目 : Study on aggregation mechanisms of a hydrogenotrophic methanogen, *Methanothermobacter* sp. CaT2, by characterization of aggregation mutants
(水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 の凝集性変異株の解析による凝集機構の研究)

上向流嫌気性汚泥床(UASB)型メタン発酵槽の安定的な稼働にはグラニュール(微生物塊)形成が重要であることが知られる。グラニュール形成には、メタン発酵を行う複数の微生物が関与し、凝集性をもつメタン生成菌も重要な役割を果たすと考えられている。特に水素資化性メタン生成菌は発酵性生物と共生することで基質の資化効率を上げるとの報告があり、その凝集性が共生関係の強化に関与すると考えられている。水素資化性メタン生成菌は遺伝子組換え法が確立されていないが、表層糖が凝集に関与する報告がすでにされており、また、他のメタン生成菌では細胞外 DNA やタンパク質も微生物間の凝集に関与しているとの報告がある。本研究では、凝集する水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 株より、凝集性が低下した変異株 CLA160 株及び凝集性が増加した変異株 CHA001 株と CHA002 株を取得し、その生理学的特徴およびゲノム変異を解析することで CaT2 株の凝集機構に関する知見を得た。

まず、培養菌体をプロテアーゼ処理したところ、CaT2 株、CHA001 株と CHA002 株では凝集性の低下が確認されたが、CLA160 株では影響がほぼなかったことから、細胞外タンパク質の凝集への関与が示唆された。また、CHA002 株はプロテアーゼ処理によって完全に凝集性が低下しなかったことからタンパク質以外の関与も示された。次に、CLA160 株のゲノム配列解析によって、機能未知である *MTCT_1020* 遺伝子に終止変異が入り大部分が欠失していることが明らかとなった。また、構造解析によって、*MTCT_1020* が細胞表面に突出していることが予測されたことから、このタンパク質によって CaT2 が凝集している可能性が示唆された。一方、CHA001 株と CHA002 株のゲノム配列解析により、両株において複数遺伝子への変異が確認されたことから、ゲノムへの変異によって凝集性が強化されたことが示された。これらの結果より、CaT2 株の凝集は主に細胞外タンパク質が関与しているが、タンパク質以外の物質も凝集の一因として関連していることが示唆された。

(別紙様式第7号)

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1576 号	氏名	澄川 佳奈
論文審査担当者	主査	山田 守	
	副査	内海 俊彦	
	副査	薬師 寿治	
	副査	高坂 智之	
	副査		
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) Study on aggregation mechanisms of a hydrogenotrophic methanogen, <i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2, by characterization of aggregation mutants (水素資化性メタン生成菌 <i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2 の凝集性変異株の解析による凝集機構の研究)			
関連論文 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) <基礎となる学術論文> 題目 An aggregation-defective mutant of <i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2 reveals a unique prote in-dependent aggregation (<i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2の凝集性低下変異株は特有な蛋白質依存性凝集を明らかにする) 掲載誌 <i>Microbes Environ</i> , 34(3):244-251. doi: 10.1264/jsme2.ME19014 (2019年6月 <input type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			
題目 Characteristics of physiology of and genomic mutations in aggregation-enhanced mutants of <i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2 (<i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2の凝集性亢進変異株の生理学的特徴とゲノム変異) 掲載誌 <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i> , doi: 10.1080/09168451.2019.1709790 (2020年1月 <input type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			
<参考論文> なし 題目 (和訳) 掲載誌 (年 月 <input type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			

(論文審査の要旨)

上向流嫌気性汚泥ろ床(UASB)型メタン発酵槽の安定的な稼働にはグラニュール(微生物塊)形成が重要であることが知られる。グラニュール形成には、メタン発酵を行う複数の微生物が関与し、凝集性をもつメタン生成菌も重要な役割を果たすと考えられている。特に水素資化性メタン生成菌は発酵性生物と共生することで基質の資化効率を上げるとの報告があり、その凝集性が共生関係の強化に関与すると考えられている。水素資化性メタン生成菌の遺伝子組換え法が確立されていないが、表層糖が凝集に関与する報告がすでにされており、また、他のメタン生成菌では細胞外 DNA やタンパク質も微生物間の凝集に関与しているとの報告がある。本研究では、凝集する水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 株より、凝集性が低下した変異株 CLA160 株及び凝集性が亢進した変異株 CHA01 株と CHA002 株を取得し、その生理学的特徴およびゲノム変異を解析することで CaT2 株の凝集機構に関する知見を得た。

まず、培養菌体をプロテアーゼ処理したところ、CaT2 株、CHA001 株と CHA002 株では凝集性の低下が確認されたが、CLA160 株では影響がほぼなかったことから、細胞外タンパク質の凝集への関与が示唆された。また、CHA002 株はプロテアーゼ処理によって完全に凝集性が低下しなかったことからタンパク質以外の関与も示された。次に、CLA160 株のゲノム配列解析によって、機能未知である *MTCT_1020* 遺伝子に終止変異が入り大部分が欠失していることが明らかとなった。また構造解析によって、*MTCT_1020* が細胞表面に突出していることが予測されたことから、このタンパク質によって CaT2 が凝集している可能性が示唆された。一方、CHA001 株と CHA002 株のゲノム配列解析により、両株において複数遺伝子への変異が確認されたことから、ゲノムへの変異によって凝集性が強化されたことが示された。これらの結果より、CaT2 株の凝集は主に細胞外タンパク質が関与しているが、タンパク質以外の物質も凝集の一因として関連していることが示唆された。

本研究は、CaT2株の凝集能が改変された変異株を取得しその生理学的及びゲノム変異の解析を行うことによって、水素資化性メタン生成菌の凝集機構に対する知見を初めて得た。特に上述のように、凝集性低下株の解析から機能未知タンパク質が主に凝集の形成に関わることを、そして、その強化に Mg^{2+} や Ca^{2+} が関与することを明らかにした。また、凝集性が亢進した変異株の解析によって、タンパク質以外の物質も凝集に関与することを明確にした。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。