

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

**Physiological Characteristics and Genomic Properties of
Nitrosomonas mobilis Isolated from Nitrifying Granule of
Wastewater Treatment Bioreactor**

申請者

Soe Myat Thandar

ソー ミヤット サンダー

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2016年12月

1. 論文内容の要旨

硝化 (Nitrification) は、地球環境における窒素循環や排水処理場の生物学的窒素除去プロセスにおける重要な反応である。この反応はアンモニア酸化微生物 (アンモニア酸化細菌, 古細菌) によるアンモニアから亜硝酸への酸化反応と亜硝酸酸化細菌による亜硝酸から硝酸への酸化反応の二つのステップから成り立っている。アンモニア酸化細菌は、温度や pH などの物理化学的因子を含む環境要因に影響を受けることが知られているが、実験室での培養が難しいために純菌株が少ない。したがって、アンモニア酸化細菌の詳細な生理学的性質やゲノム情報が依然として乏しいのが現状である。アンモニア酸化細菌は系統学的に *Betaproteobacteria* 綱に属する *Nitrosomonas* 属および *Gammaproteobacteria* 綱に属する *Nitrococcus* 属に分類される。特に、排水処理槽においては、*Nitrosomonas mobilis*, *Nitrosomonas europaea* 等が優占し、アンモニア酸化を担っていることが知られている。しかしながら、*Nitrosomonas mobilis* の性質は未知な点が多く、環境中でどのように適応して生存しているのか、解明されていない。そこで本研究では、排水処理槽の硝化グラニューールから分離培養された *Nitrosomonas mobilis* Ms1 純菌株を対象とし、詳細な生理学的性質を明らかにした。さらに Ms1 株のゲノム情報を取得し、構成遺伝子を明らかにすることで、*Nitrosomonas mobilis* の生理生態を考察した。

アンモニア酸化細菌の生態を制御している重要な環境因子として、温度と pH を取り上げ、インドフェノール法とグリース試薬によるアンモニア酸化量の測定から最適温度と最適 pH を決定した。一方、アンモニアと亜硝酸が Ms1 株の生育に与える影響を調べるため、アンモニア酸化活性試験を行い、既往研究で報告されている他の既存株と比較した結果、Ms1 株は *Nitrosomas europae* を含む cluster 7 と比べると比較的低濃度の基質で阻害を受けるが、*Nitrosomonas oligotropha* を含む cluster 6a よりも高濃度の基質に耐性があることを見出した。また、最大比増殖速度を決定したところ、Ms1 株は他のアンモニア酸化細菌と同程度の速度を持つことを見出した。さらにミカエリス・メンテン式に基づき、酸素に対する見かけの半飽和定数と最大比消費速度、アンモニアに対する見かけの半飽和定数と最大比消費速度を決定した。カルチャーコレクションから取り寄せた *Nitrosomonas europaea* についても見かけの半飽和定数と最大比消費速度を決定し、比較検証した。

一方、*Nitrosomonas mobilis* のゲノム解析を実施し、3.09Mbp のシーケンス長を得た。GC 含有量は 48.53%であった。16S rRNA 遺伝子、*amoA* 遺伝子、全ゲノムの *Nitrosomonas europaea* ATCC との相同性は、それぞれ 95.8%, 90.9%, 70.7%であり、*Nitrosomonas* 属に分類される他の種とは、大きく異なることがわかった。他のアンモニア酸化細菌と異なる特徴として、Ms1 株は S 層タンパクをコードする遺伝子 (*rsaA*) やストレス耐性等の特徴的な機能遺伝子を保持していた。以上の生理学的な解析とゲノム解析の結果から、Ms1 株が他の *Nitrosomonas* 属細菌に比べて高濃度の亜硝酸に対する耐性を有していることで排水処理槽内の環境変動に適応できるポテンシャルを持っていることが明らかになった。

2. 論文審査結果

2016年11月15日に行われた公聴会では、論文内容および関連する事項について質疑応答が行われた。その概要を以下に示す。

1. 第3章のアンモニア酸化に関与する遺伝子クラスターについて Ms1 株の特徴を問う質問があった。これに対して、「Ms1 株はアンモニア酸化系の遺伝子 (*amoA*, *haoA*, *cycA* など) を複数コピー保持している。これは、*Nitrosomonas europaea* 等の *Betaproteobacteria* のアンモニア酸化細菌において共通の特徴である。これらの重複した遺伝子コピーは擬遺伝子ではなく、機能的な遺伝子であると考えている。他のアンモニア酸化細菌と同様に、Ms1 株には2組の *amoCAB* オペロンが存在していたが、他のアンモニア酸化細菌に見られるような第3の *amoC* 遺伝子は存在していなかった」という説明がなされた。
2. 第3章の遺伝子発現の定量解析において、解析対象とした遺伝子の選定理由および高濃度亜硝酸 (300mM) の系で *nirK* だけが発現している理由について質問があった。これに対して、「予備審査会において、取得したゲノム情報の代謝経路で最も重要なポイントを明らかにすべきという指摘を受けたことを踏まえ、Ms1 株において重要な窒素代謝関連遺伝子を対象にしたトランスクリプトーム解析を行った。Ms1 株が高濃度の基質 (アンモニア, 亜硝酸) において耐性をもっていることが第2章の実験結果から明らかになっていたため、本実験では、高濃度の基質においてアンモニア酸化や亜硝酸還元, アンモニア同化, トランスポーターに関わる遺伝子がどの程度発現しているか、調査した。既往研究において、*Nitrosomonas europaea* は亜硝酸濃度の増大とともに *nirK* の発現量が増大したが、*Nitrosomonas eutropha* や *Nitrosomonas multifolmis* は、*nirK* の発現量に変化がなかった。他の遺伝子についても種によって発現量に違いがあることから、近縁なアンモニア酸化細菌種間において影響を受ける遺伝子は様々であり、共通性を見出すことは難しい」という説明がなされた。
3. Ms1 株の生理学的知見やゲノム情報から、この株が環境中で生存できる理由について、どのように考察できるのか、という質問があった。これに対して、「Ms1 株は、高濃度の基質に対して耐性があり、多様な抵抗性タンパクをコードする遺伝子を持っていることから、排水処理槽において適応できるポテンシャルを持っている」という説明がなされた。
4. 今後の展望として具体的な研究の方向性を問う質問があった。これに対して、「高濃度の基質に晒された培養条件下での窒素代謝関連遺伝子発現データを基にして、

個々の代謝経路についての作用機序を検討する研究が考えられる」という回答がなされた。また、「Ms1 株の形態的な特徴として、細胞同士が凝集したマイクロコロニーを形成する性質がある。しかしながら、マイクロコロニーの形成メカニズムについては未解明な点が多い。本研究で得られた生理学的知見とゲノム情報を踏まえ、トランスクリプトーム・プロテオーム解析を実施することで、マイクロコロニーの形成メカニズムが明らかにする研究が考えられる」という説明がなされた。

5. 第2章の生理学実験結果と第3章のゲノム解析結果から明らかになった Ms1 株の性質について、結論を示す概略図があった方が良く、という指摘を受けた。これに対して、「Ms1 株と他のアンモニア酸化細菌で得られている知見を比較・検証し、Ms1 株の特徴を示す概略図を博士論文の第4章に追記する」という回答がなされた。
6. 本研究の意義や得られた結果に対する考察をより具体的に記載した方が良く、という指摘を受けた。これに対し、「*Nitrosomonas mobilis* は様々な自然環境中や排水処理槽で存在するにもかかわらず、生理学的・ゲノム科学的知見がほとんど得られていないため、本研究成果は大きな意義があると考えている。第1章で本研究の意義を明確にし、第2章の生理学実験結果と第3章のゲノム解析結果をつなぐ考察を第4章に追記する」という回答がなされた。

以上の質疑応答を通じ、申請者が本研究の意義と実験結果について十分な学識を有し、必要と考えられる考察を行っていることがわかった。また、公聴会後に提出された修正論文は、公聴会における審査員からの指摘を踏まえて十分な修正がなされていることを確認した。本研究では、自然環境や排水処理槽に生息するアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas mobilis* の生理学的性質とゲノム特性を明らかにし、その生態を考察した。*Nitrosomonas mobilis* の性質が明らかになったことで、排水処理槽におけるアンモニア酸化活性の新しい制御方法の創出が期待される。このように本論文は、環境微生物学や微生物工学における研究領域を発展させる優れたものであり、博士（工学）の学位論文としてふさわしいと考えられる。

2016年12月

主査 常田 聡 早稲田大学教授 博士（工学）東京大学 _____

仙波憲太郎 早稲田大学教授 理学博士（東京大学） _____

竹山春子 早稲田大学教授 博士（工学）東京農工大学 _____