

氏名	森永 花菜		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 9 0 7 8 号		
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<i>Paracoccus denitrificans</i> における集団形成メカニズムの解析		
主査	筑波大学教授	博士 (工学)	野村 暢彦
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	高谷 直樹
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士 (工学)	橋本 義輝

## 論 文 の 要 旨

水処理は 21 世紀の重要な環境課題であり、水処理施設における排水処理効率の向上が求められている。実際の水処理施設では、活性汚泥により有機物・窒素化合物・リンなどが除去される。活性汚泥は様々な微生物からなる複合微生物体（フロック）であり、特に窒素化合物の除去には、その中の *Paracoccus denitrificans* がかわることが明らかにされている。しかし、*P. denitrificans* の諸性質は十分に明らかにされていない。

著者は、*P. denitrificans* の相互作用機構と集団形成（バイオフィーム）機構について研究を進め、相互作用においては細胞間では疎水性の高い細菌シグナルが細胞外膜粒子 (MV) によって運搬されること、集団形成においては細胞が自己組織化することを明らかにした。

多くの細菌はシグナル分子を介して情報伝達が行われる。特に、菌体密度依存的なシグナル伝達機構をクォーラムセンシング (QS) と呼ばれ、最も多くの細菌で報告されている QS シグナルとして、アシル化ホモセリンラクトン (AHL) が挙げられる。筆者は、*P. denitrificans* の AHL 伝達機構に関して分子生物学的手法を用いて詳しく解析し、*P. denitrificans* は短鎖の AHL には応答しない一方で、C12 以上の長鎖の AHL に応答することで *P. denitrificans* の凝集を回避することを明らかにした。また、MV を介した異種細菌との相互作用の可能性についても解析を行い、*P. denitrificans* の MV は長鎖 AHL を吸着し、*P. denitrificans* に伝達することを示した。つまり、MV を用いることで、他の細菌から産生される長鎖 AHL を情報として選択し、自身の凝集回避行動など環境適応していることが示唆された。実際に、各種長鎖 AHL によって、C16-HSL と同様に、*P. denitrificans* の細胞凝集が抑制されることを証明している。

次に筆者は、*P. denitrificans*の集団形成機構についてデバイス・イメージング解析技術を用いて研究した。まず、*P. denitrificans*が細胞レベルでの基質また細胞への付着について解析を行い、細胞表層に局在するBapAが基質の付着因子として、同じく細胞表層に局在する多糖(Pmx(*Paracoccus extracellular matrix*))が細胞間及び細胞と基質間の付着因子として働くことを明らかにした。また、そのPmxの制御についても解析を行い、Pmxの遺伝子発現はQSにより抑制されることも明らかにしている。さらに、マイクロデバイスを用いて、基質上での細胞集団形成機構を共焦点レーザー顕微鏡・大気圧走査電子顕微鏡などを用いながら三次元構造を詳細に調べ、*P. denitrificans*は菌体間距離を保ちながら一層で増殖し一定間隔で自己組織化することを見いだした。興味深いことに、*P. denitrificans*は桿菌であるが、細胞密度が高くなると細胞が立ち整列して（上から見ると）正六角形の一層構造になり、一層のまま増殖が行われ、細胞の付着面の逆サイドで細胞分裂が起こり切り離され他へ移動することを明らかにした。また、その現象にはQSが関与することも示しており、*P. denitrificans*の大変ユニークな自己組織化を見いだしていると共に、それが細菌間の相互作用機構により制御されていることを世界で初めて明らかにしている。

## 審 査 の 要 旨

これまで細菌の相互作用においては、細胞密度が高くなったときつまり細胞が集団になった時に細菌シグナルが機能し様々な遺伝子制御が行われるものと認識されている。しかし、著者により、*P. denitrificans*では逆に細菌シグナルにより集団形成（バイオフィーム）を抑制することが見いだされた。そして、細菌シグナルがメンブレンベシクル(MV)に吸着することも明らかにしている。さらに、*P. denitrificans*は基質表層では、一層で増殖し自己組織化しハニカム構造になることを発見している。そして、その自己組織化には自身が産生する細菌シグナルが関与することも示されている。

以上のように、細菌の相互作用においてこれまでの集団化とは逆の集団回避という現象をその機構を遺伝子レベルまで明らかにした。また、細菌において基質表層で桿菌細胞が整列化しハニカム構造になる自己組織化現象を世界で初めて発見し、細菌の生態に新たな知見を与えている。これらのことは基礎のみならず、水処理において窒素除去の主役である*P. denitrificans*の制御にも大きく貢献することが見込まれ高く評価出来る。

平成31年1月11日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。