

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ランタノイド存在下におけるMethylosinus trichosporium OB3bのグリセロールによる増殖阻害とその回避メカニズム
Title(English)	Restoration mechanism of glycerol-induced growth inhibition of Methylosinus trichosporium OB3b in the presence of lanthanides
著者(和文)	椎名 渉
Author(English)	Wataru Shiina
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12747号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:蒲池 利章,和地 正明,福居 俊昭,平沢 敬,朝倉 則行
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12747号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	椎名 渉		審査員主査： Chief Examiner	蒲池 利章	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【はじめに】

Methylosinus trichosporium OB3b (OB3b 株)は、メタンを単一の炭素源として生育することができるメタン酸化細菌である。メタン酸化細菌は、メタンモノオキシゲナーゼやメタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) などの一炭素化合物の代謝に関わる酵素を有しているが、多炭素化合物の代謝についてはあまり知られていない。例えば、細菌の炭素源や凍結保護剤として用いられるグリセロールは、メタン酸化細菌の増殖を阻害するがそのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、OB3b 株におけるグリセロールとランタノイドイオンによる増殖阻害のメカニズムの解明を目指した。また OB3b 株の工業的な応用に向けて、グリセロールによる増殖阻害を回避する手法の探索およびそのメカニズムの解明を目指した。

【結果と考察】

[1] グリセロール耐性株の解析と OB3b 株の Ln トランスポーターの同定

セリウムイオン存在下で培養した OB3b 株のグリセロールを用いた凍結保存菌体の作成の過程で生じたグリセロール耐性株を用いた。単離した株を全ゲノムリシーケンシングしたところ、TonB 依存性トランスポーターをコードする遺伝子上の機能喪失変異を同定した。比較ゲノム解析から、この遺伝子は、*Methylorubrum extorquens* AM1 の Ln トランスポーター遺伝子 *lutH* のオルソログであることが明らかとなった。OB3b 株における *lutH* の機能を調べるために、OB3b 株の *lutH* 破壊株および *lutH* 補完株を構築し、これらの MDH 発現パターンを調べた。その結果、完全長の *lutH* と Ce^{3+} イオンの存在が XoxF1 の発現に必要であったことから、OB3b 株の *lutH* は Ln トランスポーター遺伝子であると考えられる。

変異株の出現とグリセロールの関連を調べるために、強い増殖阻害が起きるグリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下で OB3b 野生株の実験室進化を行った。2 回の継代後に単離した株は、グリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下での増殖阻害が緩和された。単離した株は、 Ce^{3+} イオン存在下でも XoxF1 が発現せず、*lutH* 上に機能喪失変異があることが分かった。この結果から、(1) グリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下での培養によりグリセロール耐性株が生じること、(2) *lutH* に機能喪失変異が入り Ln^{3+} イオンが取り込まれなくなるためグリセロール耐性を獲得することを明らかにした。

[2] グリセロールと Ln^{3+} の共存下での OB3b 株の増殖阻害メカニズム

グリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下で増殖が阻害された OB3b 野生株菌体の分光分析から、OB3b 株の菌体内で Maillard 反応が起きている可能性が示唆された。この反応は活性カルボニル種により引き起こされることが知られている。蛍光特性の変化を指標とした静止菌体の分析から、MDH の不可逆的阻害剤で処理した菌体ではグリセロールの影響が見られなかった。また、同様の蛍光特性変化が OB3b 野生株へのグリセロール添加で起こった。これらの結果から、グリセロールが XoxF1 などの MDH により酸化されグリセリアルデヒドが生じ、生じたグリセリアルデヒドによる Maillard 反応が OB3b 株の増殖阻害に関与すると考えられた。

[3] XoxF1 発現条件下でのグリセロール代謝

[1] で述べたグリセロール耐性株では、完全なグリセロール毒性の回避に至っていない。*lutH* への変異以外の耐性獲得機構を探索するため、 Ln^{3+} イオン要求性である Δ *mxoF* 株を用いてグリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下で実験室進化を行った。2 回の継代後に単離した株は、グリセロールと Ce^{3+} イオンの存在下でも増殖阻害が見られなかった。単離した株の全ゲノムリシーケンシングの結果、XoxF1 上の一塩基置換が同定された。この一塩基置換が XoxF1 のグリセロールに対する親和性を低下させ、グリセリアルデヒドによる毒性を低減させたと考えられる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	椎名 渉		審査員主査： Chief Examiner	蒲池 利章	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Methylosinus trichosporium OB3b (OB3b strain) is a well-known methanotroph that can utilize methane as a sole carbon source. Methane metabolism in methanotrophs has been extensively studied. For example, methanol dehydrogenases, critical enzymes of methane metabolism, were known to be divided into two types: calcium-dependent MxaFI and lanthanide-dependent XoxF. However, multi-carbon metabolism in methanotrophs has not been studied well. Notably, many methanotrophs do not metabolize glycerol; in addition, it causes a toxic effect on them with an unknown mechanism. In this study, the elucidation of the toxic mechanism of glycerol on the OB3b strain cultured with Ce^{3+} ion was conducted.

Characterization of the OB3b mutants isolated during the cryopreservation with glycerol of OB3b strain cultured with Ce^{3+} ion was carried out. Whole genome resequencing analysis of the mutant showed that one TonB-dependent receptor gene was mutated. This gene was found to be orthologous to *luth* of *Methylobacterium extorquens* AM1. *luth* disruption and complementation analysis in OB3b strain suggested that *luth* was involved in lanthanide uptake. To investigate the relationship between *luth* mutation and glycerol toxicity, adaptive laboratory evolution (ALE) of OB3b wild-type in the presence of Ce^{3+} ion and glycerol was performed. This condition caused severe growth inhibition in OB3b wild-type. Analysis of an ALE strain indicated that cultivation with both Ce^{3+} ion and glycerol resulted in the loss-of-function mutation on *luth*, which suppressed growth inhibition.

Fluorescence spectrometry and SDS-PAGE analysis of OB3b wild-type revealed that the Maillard reaction occurred in the cells cultured with both Ce^{3+} ion and glycerol. Resting cell analysis of the OB3b wild-type showed that the Maillard reaction did not occur in MDH-inhibited cells. Moreover, glyceraldehyde, an oxidative product of glycerol, also caused the Maillard reaction of OB3b cells. From these observations, I concluded that MDHs, mainly XoxF1, oxidized glycerol to glyceraldehyde, which caused toxicity to OB3b cells.

To eliminate growth inhibition by glycerol, ALE of OB3b $\Delta mxaF$ strain, a knockout mutant of *mxoF* and required lanthanide ion for its growth, was carried out in the presence of Ce^{3+} ion and glycerol. $\Delta mxaF$ -EvoGlyc mutant strain that could grow to reach the OD_{540} at > 3.0 in the presence of Ce^{3+} ions and glycerol was isolated. The mutation on *xoxF1* from the $\Delta mxaF$ -EvoGlyc strain was found. Resting cell analysis of the $\Delta mxaF$ -EvoGlyc strain suggested that the mutation reduced the affinity of XoxF1 for glycerol, resulting in the elimination of glyceraldehyde toxicity.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).