



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification and genetic characterization of microbes which are highly sensitive to hydrogen peroxide in the agar plate [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	渡邊, 統之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15299号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89869
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Watanabe_Motoyuki_review.pdf, 審査の要旨



【課程博士】

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 渡 邊 統 之

審査担当者	主 査	客員准教授	北 川 航
	副 査	客員 教授	鎌 形 洋一
	副 査	客員 教授	湯 本 勲
	副 査	教 授	曾 根 輝 雄 (本学国際食資源学院)

学 位 論 文 題 名

Identification and genetic characterization of microbes which are highly sensitive to hydrogen peroxide in the agar plate
(寒天培地中の過酸化水素に極めて高い感受性を示す微生物の同定および遺伝学的分析)

本論文は英文 83 頁，図 9，表 5，5 章からなり，参考文献 3 編が付されている。

本研究は寒天培地中の過酸化水素 (H_2O_2) が微生物のコロニー形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、1) H_2O_2 濃度の異なる寒天培地を用いた微生物の培養実験および H_2O_2 に極めて高い感受性を示す微生物株の単離、2) 単離株の全ゲノム解析、3) ゲノム内に存在するカタラーゼ遺伝子のクローニングによる遺伝子産物の機能解析を行い、以下のような結果を得ている。

1. 寒天培地中の過酸化水素が実験室微生物株および環境試料由来微生物の生育に与える影響

自然環境由来の微生物の多くは実験室環境において培養することが不可能で、特に固体培地上に形成されるコロニー数は顕微鏡による直接観察の細胞数と比べ極めて少ないことが報告されている。先行研究により寒天培地の作製時に過酸化水素 (H_2O_2) が生成されることが明らかとなり、寒天培地上でのコロニー形成を妨げる要因の一つであることが示唆された。しかし純粋に H_2O_2 のみの影響を明らかにした報告は無く、どれほどの H_2O_2 濃度がどのような微生物の生育に影響を及ぼすかは調べられていなかった。本研究では先ず、 H_2O_2 が濃度依存的に微生物の生育に及ぼす影響を調査した。様々な H_2O_2 濃度の寒天培地を用いて実験室微生物株の生育を比較した結果、その全てが 48.8 μM かそれ以上の濃度でもコロニーを形成することが明らかとなった。対して、淡水環境試料微生物を同様の手法にて培養した実験においては、8.3 μM においても得られるコロニー数が大きく減少することが発見された。これらの結果は、自然環境由来の微生物が実験室微生物株に対してより高い H_2O_2 感受性を有していることを明らかにした。

また上記の淡水サンプルから得られたコロニーを無作為に選択し、16S rRNA 配列解析を行った結果、培地中の H_2O_2 濃度が高くなるにつれ、ベータプロテオバクテリア綱のコロニー

の数が減少することが確認された。この結果をもとに、ベータプロテオバクテリア綱に属する H_2O_2 に極めて高い感受性を示す微生物を単離した結果、得られた単離株 OS-1 および OS-4 のコロニー形成はわずか $7.2\mu\text{M}$ の H_2O_2 存在下で完全に阻害されることが明らかとなった。

2. 寒天培地中 H_2O_2 に対して高い感受性を示す環境試料由来単離株の全ゲノム解析

単離された微生物株 OS-1 と OS-4 は研究室微生物株に比べて極めて高い H_2O_2 感受性を有することが確認されたが、その高い感受性が起こる要因は全く明らかでなかった。好気性微生物は好気呼吸に伴い発生する内因性 H_2O_2 を分解するために複数の H_2O_2 分解酵素を有しており、それらが外因性 H_2O_2 に対しても有用であると考えられている。OS-1 と OS-4 の両株の全ゲノム解析を行ったところ、両株ともカタラーゼを含む H_2O_2 分解酵素系の推定遺伝子を有していることが発見された。これらの微生物がカタラーゼ遺伝子等を有していた発見はその過酸化水素感受性の高さと相反するものであり、これらの機能に非常に興味をもたれた。

3. カタラーゼ遺伝子のクローニングによる H_2O_2 感受性の原因解明

OS-1、OS-4 両株のゲノム配列からカタラーゼの推定遺伝子が発見されたが、現時点で両株が持つカタラーゼ遺伝子の産物が機能的であるかどうかは定かではなかったため、これら推定カタラーゼ遺伝子をクローニングすることによりその産物のカタラーゼ活性を確認することとした。本実験は単離株 OS-1、OS-4 の両株が持つ高い H_2O_2 感受性の要因を明らかにするべく行われた。

本研究は寒天培地中に存在する H_2O_2 の純粋かつ濃度依存的な影響を評価した初めての研究である。培養実験の結果、寒天培地中に存在する数 μM レベルの H_2O_2 は、環境試料中の微生物のコロニー数を大きく減少させ、またコロニーを形成する微生物の種類をも変化させることが明らかにした。また本研究はベータプロテオバクテリア綱の OS-1、OS-4 の 2 株を低 μM レベルの H_2O_2 に対して極めて高い感受性を持つ微生物として初めて単離した。また両単離株は H_2O_2 に対して極めて高い感受性を持ちながら、 H_2O_2 分解酵素の推定遺伝子を有していることが明らかにした。これは微生物の生理学的特性はゲノム情報から推測されるものと必ずしも一致しないことを示した。また本研究では、なぜカタラーゼを持つ微生物が低濃度 H_2O_2 に高い感受性を示すのかについてもその主要因を明らかにしており、基本的ながらも微生物学にとって非常に重要な知見をもたらした。今回得られた情報を元に今後より多くの未培養微生物の培養化、資源化に寄与すると考えられる。

よって、審査員一同は、渡邊統之が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。