

論文内容の要旨

論文題目：

Cultivation and molecular ecological studies of microbes relevant to marine sedimentary carbon and sulfur cycling (海底堆積物中の炭素・硫黄循環に関連する微生物の培養および分子生態学的研究)

氏名 青木 仁孝

海洋は地球表面積の約 70%を占め、海洋の底には海底堆積物が存在する。海底堆積物を対象とした研究成果の蓄積により、海底堆積物に生息する微生物が地球規模での炭素・硫黄循環を考える上で重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。しかし、海底堆積物に存在する大部分の微生物は、純粋分離されていない機能未知な系統分類群に属する微生物であり、海底堆積物中の微生物生態系および生物地球化学プロセスは十分に理解されていない。本論文は、北西太平洋日本沖の海底堆積物における微生物学的な炭素・硫黄循環に関して新たな洞察を得ることを目的とし、培養および分子生態学的研究手法により得られた知見を報告したものである。本論文の各章の内容は以下のとおりである。

第 1 章では、本論文の内容に関わる既往の知見と本論文の目的について述べた。

第 2 章では、down-flow hanging sponge (DHS) バイオリアクターを用いて嫌氣的メタン酸化微生物群集の集積培養を行った結果を報告した。本章の主目的は、嫌氣的メタン酸化微生物群集に対する DHS バイオリアクター培養法の有効性の評価と植種源として用いた南海トラフのメタン湧水堆積物における嫌氣的メタン酸化反応に関連する微生物群の特定であった。集積培養後にはどのような微生物種が DHS バイオリアクター内で培養されているのかを特定するため、16S rRNA とその遺伝子を対象としたクローン解析を行った。その結果からは、嫌氣的メタン酸化反応を行っているかと推定される anaerobic methanotroph (ANME) アーキア群 (ANME-1、-2a、-2c および-3) に加えて、未培養系統アーキア (MBG-D や DSAG 等) や *Gammaproteobacteria* 綱の未培養系統バクテリア等の多種多様な微生物が DHS バイオリアクターにより培養されていることが判明した。検出された ANME アーキア群の中では、ANME-2a が集積培養体における優占種として特定された。Fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析からは、ANME-1、ANME-2a および大部分の ANME-2c 細胞が単独で集積培養体中に存在していることが示された。この FISH 解析の結果からは、検出された ANME アーキア群がバクテリア非依存的な嫌氣的メタン酸化反応を行っている可能性が示された。また、集積培養体からは嫌氣的メタン酸化活性ポテンシャルも検出された。以上の結果より、嫌氣的メタン酸化微生物群集の培養に DHS バイオリアクターが有効な手法の 1 つであると判断した。

第 3 章では、自然環境中に豊富に存在するキノン化合物の酸化・還元状態により変化する酸化還元電位の違いがメタン湧水堆積物の微生物群集構造に与える影響の可能性について報告した。具体的には、モデルキノン化合物のアントラキノン-2,6-ジスルホン酸の酸化・還元状態を電極反応により制御し、異なる酸化還元電位環境を生物電気化学リアクタ

一内に創出することでその影響を調査した。培養条件は、炭素・硫黄循環に関わる微生物群を集積培養するために嫌氣的メタン酸化反応に基づいて設定した。植種源には、第2章で得た集積培養体を用いた。16S rRNA 遺伝子を対象としたクローン解析結果からは、設定した電極電位 (-0.4V または -0.6V) に応じてリアクター内で優占化するアーキアおよびバクテリアの微生物種が異なることが示された。この結果は、キノン化合物の酸化・還元状態によって変化する酸化還元電位の違いがメタン湧水堆積物の微生物群集構造を決定する因子となる可能性を示すものであった。

第4章では、海底下堆積物における微生物学的な硫黄循環の理解を深めるため、海底下堆積物環境においてその多様性や分布情報の乏しい異化型硫酸塩還元・硫黄酸化反応に関与する *aprA* 遺伝子の多様性解析結果について報告した。本報告では、房総半島沖、下北半島沖および南海トラフの3つの異なる地点から回収した堆積物試料を解析対象とした。*aprA* 遺伝子のクローン解析により、90%の塩基配列相同性において 135 の *aprA* 遺伝子 operational taxonomic unit (OTU; 操作的分類単位) が取得され、解析した海底下堆積物環境に極めて多様な *aprA* 遺伝子が存在することが明らかとなった。また、海底表層においては *Desulfobacteraceae* 科の推定硫酸塩還元菌が、海底下深部環境では本研究で定義した AprA cluster I に属する *aprA* 遺伝子を有する推定硫酸塩還元菌が優占的な系統群であることが示された。加えて、海底下深部環境試料における推定硫黄酸化菌と推定硫酸塩還元菌由来の *aprA* 遺伝子の存在は、海底下深部環境において酸化的小および還元的小な微生物硫黄循環の両方が生じていることを示唆した。硫黄酸化細菌 *aprA* lineage I に属する *aprA* 遺伝子が海底下深部試料から高頻度に検出された結果からは、ある特定の硫黄酸化細菌が海底下深部の隠微な硫黄循環において重要な役割を担っている可能性が示された。

第5章では、本論文で得られた結果を総括した。