

論文内容の要旨

論文題目：未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定と海底堆積物からの
嫌気共生細菌の培養の試み

氏名 斎藤 弥生

地球上に存在するメタンの半分以上は微生物由来であると考えられている。そのメタンは嫌気的な環境で複数の微生物が連携し、有機物を完全分解することで生成される。微生物反応によって生成されたメタンは嫌気的な環境から普遍的に確認されていること、さらに温室効果ガス・重要なエネルギー源でもあると捉えられていることから、メタン生成アーキアを含む有機物分解に関与する微生物は地球規模の炭素循環に大きな影響を及ぼしていると考えられている。そこで、本論文では、地球上の炭素循環に関わる微生物の基礎的知見を集めることを目的とした。特にメタン生成過程に関与していると考えられる微生物の中でも、人為的な培養がなされておらず、16S rRNA 遺伝子を指標にした系統分類上の位置や菌学的特性が明らかになっていないメタン生成アーキアと嫌気共生細菌に着目した知見を示した。

本論文の第一章では研究の背景、目的及び本論文の構成について述べた。

第二章では、環境中での微生物による有機物分解の流れ、メタン生成アーキアと嫌気共生細菌についての既往の知見を述べた。

第三章では、未培養メタン生成アーキアの系統学的位置の特定を試みた結果について述べた。排水処理汚泥を対象にメタン生成アーキア固有の機能遺伝子 methyl coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) 遺伝子と系統分類の指標に用いられている 16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析を行った。その結果、どちらの菌叢解析においても未培養グループに属する配列が 1 グループずつ検出された。*mcrA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹を作成し、2つの系統樹を比較したところ、MCR-2b と呼ばれる未培養グループの *mcrA* 遺伝子を有する細胞と WCHA1-57 と呼ばれる未培養アーキア由来の 16S rRNA 遺伝子を有する細胞は、同一である可能性が示唆された。MCR-2b と WCHA1-57 の系統関係について述べられた報告は今のところ存在しておらず、本研究結果は未培養メタン生成アーキアに関する新たな知見となった。また、この両者の関係性を明確化するために、ゲノム DNA 情報を獲得することを最終的な目的として WCHA1-57 アーキア細胞の 16S rRNA を標的とした catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法および MCR-2b 細胞の *mcrA* 遺伝子を標的とした two-pass tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法で目的細胞を検出させ、フローサイトメーターで目的細胞の回収を試みることにした。しかしながら、残念なことに FISH 法による細胞の可視化が出来なかったことから、ゲノム DNA 情報をも獲得することが出来なかった。その一方で、WCHA1-57 アーキア細胞を FISH 法で検出するための細胞壁処理検討に関する結果は、今後 WCHA1-57 アーキアに対する分子生物学的手法適用する際に有用な知見と成り得ることから、その詳細も併せて報告した。

第四章、第五章および第六章では、海底堆積物中の嫌気共生細菌に着目した研究結果について述べた。海底下では嫌気共生細菌を介した有機物分解が行われているか定かではないことから、実際に海底堆積物から嫌気共生細菌を培養・分離することで、その経路の存在の有無を確認した。

第四章では、下降流懸水型スポンジリアクター (down-flow hanging sponge: DHS) とバッチ式集積培養法を用いて海底堆積物から嫌気共生細菌の集積培養を試みた結果について述べた。DHS リアクターに基質としてグルコースを供給することで有機物分解に関与する一連の微生物群の集積を行い、その集積培養サンプルを植種源としてバッチ式集積培養を行った。基質として酢酸、酪酸、プロピオン酸とエタノールを唯一の炭素源として 10°C もしくは 25°C でバッチ培養を行ったところ、10°C および 25°C の酪酸集積培養系から既に酪酸酸化共生菌として知られている *Syntrophomonas bryantii* の集積が確認でき、海底下から初めて嫌気共生細菌の集積培養系の獲得に成功した。また、酢酸の集積培養系からも嫌気酢酸酸化共生菌の可能性を有する *Clostridiales* 目に属するバクテリアの増殖が確認された。

第五章では、*Clostridiales* 目に属するバクテリアの純粋分離を試みた結果について述べた。*Clostridiales* 目に属するバクテリアが酢酸酸化共生細菌であることを確認するためには、純粋分離をする必要があった。純粋分離するための基質としてメタン生成アーキアに依存せずに単独で生育することができ、かつ、増殖効率が良い基質を探した。その結果、クロトン酸を基質に、生育補助剤として yeast extract で培養させたところ、目的のバクテリアが優占した。胞子を形成していたため、その特性を利用し、低温殺菌(90°C で 20 分間)をしたところ、純粋分離に成功した。純粋分離に成功した MO-YS 株と最も相同性が高いバクテリアは "*Clostridium aminobutyricum*" であり、16S rRNA 遺伝子上で 92% の相同性を有していた。

第六章では、MO-YS 株の特性を解析した結果について述べた。第一に、水素資化性メタン生成アーキアと共生関係を再度構築させることで MO-YS 株が嫌気酢酸酸化能を有しているか確認を行った。*Methanobacterium* sp. と人工的に共生させ、¹⁴C をラベルした酢酸で酢酸の酸化量を推定したところ、約 0.4% の酢酸が酸化されていた。この結果は、酢酸酸化ポテンシャルを有する可能性を示すものであるが、酢酸の完全酸化を示すデータはこれまでのところ得られていない。この嫌気共生酢酸酸化ポテンシャルを明確なものにするために共生パートナーとして *Methanoculleus marisnigri*、*Methanoculleus submarinus* および *Methanobacterium* sp. の 3 種類と共培養を試みた他に、電子伝達物質として活性炭を培養系に混合させることで酢酸酸化とメタン生成反応の促進を試みた。しかしながら、これらの培養方法では有意な結果は観察されなかった。したがって、今後は、より自然環境に近い条件、例えば、高圧条件下等での培養等より詳細な検討が必要であることが推測された。第二に、MO-YS 株の菌学的性質について調べた結果を記載した。

第七章には、本論文の総括を述べた。

以上のように、本論文は嫌気共生細菌とメタン生成アーキアに対する新規知見を提供し、地球上の炭素循環に関わる基礎的知見を与えたと言える。