

氏名（本籍）	小林 和輝		
学位の種類	博 士（ 生物工学 ）		
学位記番号	博 甲 第 9862 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 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	イロハモミジ樹皮からの多様な未知・未培養微生物の培養化と新規ライブラリーの構築		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	青柳 秀紀
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	岡根 泉
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	春原 由香里
副査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（農学）	木村 信忠

論 文 の 要 旨

近年、これまで培養化された微生物は自然界に存在する全微生物の1%にも満たないことが指摘されている。残された99%以上の未知・未培養微生物は“微生物ダークマター（Microbial dark matter）”と呼ばれ、国内外で注目を集めている。未知・未培養微生物の探索において微生物の分離・培養に使用する環境試料の選択は重要であり、未開拓の環境に着目することで未培養微生物の獲得に成功した例も複数報告されている。この現状を踏まえ著者は、樹皮の物理的・化学的特性は、共生微生物に安定的かつ特殊な環境を提供するのではないかと考え、未知・未培養微生物の新たな探索源として樹皮に着目し研究を展開した。著者は、樹皮のモデルとして日本国内で一般的に自生する落葉広葉樹のイロハモミジを選択し、樹皮試料の未培養微生物分離源としての有用性の検証や未培養微生物の取得を研究の目的とした。はじめに著者は、次世代シーケンサーを用いてイロハモミジ樹皮の細菌群集構造解析を行い、門レベルでは、(1) *Proteobacteria*門と*Bacteroidetes*門が豊富に存在している、(2) 未培養系統群を多く含む*Gemmatimonadetes*門、*Verrucomicrobia*門、*Armatimonadetes*門、*Abditibacteriota*門が存在している、ことを明らかにした。また、著者は低栄養寒天平板培地を使用してイロハモミジ樹皮から細菌株の単離培養を試み、*Actinobacteria*門に属する細菌株など、合計70株の細菌株の単離培養に成功した。単離培養に成功した70株の細菌の中の44株は、データベース中のタイプ株と97%未満の16S rDNA配列相同性を示し、新規な細菌株であることが示唆された。特に、得られた新規株のIAD-21株は*Abditibacterium utsteinense* strain R-68213^Tと91%の16S rDNA相同性を示し、分子系統解析を行った結果、*Abditibacteriota*門に属することが明らかとなった。IAD-21株とR-68213^T株との間のANI (Average Nucleotide Identity)、AAI (Average amino Acid Identity)、dDDH (digital DNA-DNA Hybridization) は同種と判断できる閾値を大きく下回っ

ており、IAD-21株が*Abditibacteriaceae*の新属である可能性も示された（*Abditibacteriota*門で2番目の単離株）。

次に著者は、イロハモミジ樹皮試料が優れた未知・未培養微生物分離源であるか否かを検証するために、次世代シーケンサーを用いて、樹皮、枝、葉、および周辺土壤に生息する細菌群集構造の解析を行うと共に、低栄養培地を用いて単離培養された細菌株の系統的新規性の比較をおこなった。次世代シーケンス解析の結果、4種の試料の中では、周辺土壤試料が新規な系統群の割合や群集の多様性が最も高いことが示された。対照的に、単離培養された細菌株では、樹皮、枝、および葉由来の細菌株の多くが、タイプ株と97%未満の16S rDNA配列相同性を示したのに対し、土壤由来の細菌株の大部分は低い系統的新規性を示した。また、樹皮試料から単離培養した細菌株の中には、*Chloroflexi*門のC0119系統群や*Gemmatimonadetes*門の*Longimicrobia*綱に属すると推定される新規性の高い細菌株が含まれていた。特にC0119系統群に属すると推定されるBA-149株は、*Chloroflexi*門の目や綱といった高次分類群レベルで新規な株である可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ著者は、イロハモミジの樹皮は未知・未培養微生物の有用な分離源であると結論づけている。

審 査 の 要 旨

本論文で著者は、未知・未培養微生物の新たな探索源として樹皮に着目し、モデルとしてイロハモミジ樹皮を選択し、次世代シーケンサーを用いた樹皮に存在する細菌の群集構造解析を行い、これまで未解明であったイロハモミジ樹皮の細菌群集構造や多様な未培養細菌が存在することを、国内外を通じてはじめて明らかにしている。樹木器官に生息する微生物群集に関する研究例は存在するが、樹皮に着目した研究は非常に少なく、研究結果の新規性は高く評価できる。また、著者は樹皮試料から細菌の単離培養を試み、*Abditibacteriota*門で2番目となる新規性が非常に高い細菌株の獲得に成功している。さらに著者は、次世代シーケンサーを用いたイロハモミジの樹皮、枝、葉、周辺土壤の試料の細菌群集構造の解析と細菌の単離培養を行い、樹皮から単離培養された細菌株は、タイプ株と97%未満の16S rDNA配列相同性を示す新規性が高いものの割合が多いことを示すと共に、*Chloroflexi*門のC0119系統群や*Gemmatimonadetes*門の*Longimicrobia*綱に属すると推定される新規性の高い細菌株の獲得に成功している。以上の成果を基に著者は、新規性が高く生態学的に価値がある、細菌ライブラリーを構築している。上述の様に本論文は、樹皮が優れた未知・未培養微生物分離源であることをはじめて示した研究であり、今後、様々な樹皮試料を対象に研究を展開することで、多様な未知・未培養微生物資源の開拓や獲得が期待できる。

令和3年1月20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（生物工学）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。