

氏名（本籍）	坂本 幸子		
学位の種類	博 士（ 環境学 ）		
学位記番号	博 甲 第 9867 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	Discovery of a Novel Subsurface Syntrophic Niche : Methoxylated Aromatic Compounds Degradation (深部地下圏でメトキシ芳香族化合物を分解する新規共生細菌の発見)		
主査	筑波大学教授	博士（工学）	野村 暢彦
副査	筑波大学客員教授	博士（農学）	玉木 秀幸
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	豊福 雅典
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	久能 樹

論 文 の 要 旨

近年、リグニン由来のメトキシ芳香族化合物（Methoxylated Aromatic Compounds:MACs）が地下のメタン生成の基質となる重要な根源有機物の一つである可能性が示されている。一方で、MAC 分解メタン生成経路はメタン生成菌、ホモ酢酸生成菌による経路が知られているが、地下圏から分離された MAC 分解菌は 1 種のみで、その実態は不明である。そこで、著者は地下圏において MAC 分解メタン生成を担う未知微生物を探索し、その生理生態機能の解明を行った。

著者は、深部地下油ガス田環境から得た MAC 分解メタン生成集積培養系を対象に分離培養を行い、新規絶対嫌気性細菌の純粋分離に成功している。また本分離株の詳細な生理性状解析ならびに分子系統解析を実施し、本株が *Firmicutes* 門に属する目レベルで新規な細菌であることを明らかにするとともに、新属新種提案並びに新目、新科の新学名を提唱している。さらに、本株がメタン生成アーキアと共生することで MAC を分解する新規共生細菌であることを明らかとした。無酸素環境下において MAC を分解する細菌は、何れも単独で MAC を単一基質として利用可能であり、著者は、世界に先駆けて、メタン生成菌との共生系で MAC を分解する共生微生物を発見している。

次に著者は、分離株が属す *Firmicutes* 門の分子系統解析手法について研究し、正確な分子系統樹の作成手法を提案している。この *Firmicutes* 門は、200 属以上の多様な微生物が存在するが、16S rRNA 遺伝子を用いた分類体系が非常に混乱している。そこで、著者は、上述の新規単離株の分子系統学的位置を明確にするため、23S rRNA 遺伝子に着目して *Firmicutes* 門の系統評価を行なったところ、23S rRNA 遺伝子を用いると、16S rRNA 遺伝子よりも統計的に信頼性が遥かに高い分子系統樹を描くことが可能であり、また、分類系統はゲノム情報を用いて決定された分類系統とよく一致することを明らかにしている。以上のことから、著者は、23S rRNA 遺伝子が *Firmicutes* 門の系統を評価する上で有効な遺伝子であることを実証するとともに、著者が分離した新規共生細菌が、目レベルで新規であることをここでも再度証明している。

さらに著者は、新規共生細菌の MAC 分解機構について研究し、特に、ゲノム情報解析により共生細菌の MAC 分解経路を検討したところ、MAC からギ酸と水素を生成する経路が考えられ、実際に培養実験でギ酸・

水素資化性メタン生成菌との共生下で MAC 分解及びメタン生成が生じることを証明している。また、共生細菌の経路はメタン生成菌及びホモ酢酸生成菌よりも低いエネルギー量で反応が進むことをゲノム解析により明らかにしている。さらに著者は、地下圏において実際に MAC 分解反応でどれくらいのエネルギー量を獲得できるか評価する必要があると考え、熱力学的解析を行い、MAC 濃度が低い条件 (<1 mM) では、メタン生成菌及びホモ酢酸生成菌は、MAC 分解反応に必要なエネルギー量を獲得できず、共生細菌のみ反応が進むことを明らかとしている。地下圏では多様な MAC が存在し得るがその濃度は低く維持されていると想定され、地下圏 MAC 分解メタン生成においては共生細菌がニッチを獲得している可能性を示した。

以上、地球におけるメタン生成において、地球地下環境に多く存在する未成熟原油に含まれるリグニン由来メトキシ芳香族化合物 (Methoxylated Aromatic Compounds:MACs) を基質とし、メタン生成する微生物が存在する事を初めて明らかにし、地下圏における微生物由来メタン生成経路の重要性を示した。

審 査 の 要 旨

審査対象論文で著者は、培養技術、ゲノム情報解析、熱力学的解析のアプローチを相互補完的に駆使することで、深部地下圏環境から、リグニン等地下の根源有機物に由来するメトキシ芳香族化合物 (MAC) の分解に関わる新たな生物機能を発見している。具体的には、著者は、深部地下圏から系統的に非常に新規性の高い、実に目(order)のレベルで新規な絶対嫌気性細菌の純粋分離に成功し、新目、新科、新属、新種の新学名提案を行っている。さらに、ゲノム情報解析から分離株がメタン生成アーキアとの共生系において MAC を分解する新規嫌気共生細菌であることを予想し、実際に培養実験により、世界で初めて共生微生物による MAC 分解反応を実証するなど先駆的な成果を挙げている。

以上のように、一般的に培養が困難とされる深部地下圏環境から、新規性の非常に高い未知嫌気性細菌を純粋分離し、ゲノム情報解析と培養実験を併用することで、本細菌がメタン生成アーキアとの共生系においてのみ無酸素環境下で MAC を分解できる、というこれまでに全く知られていない新しい生物機能を明らかにしたことは、世界初の発見であると同時に、地下圏においてメタンがどのような有機物から、どのような微生物によって生成されるのかといったメタンの生成機構を理解することに繋がるものであり、天然ガス資源の資源量評価、及び地下圏の炭素循環プロセスの全容解明にも貢献することが見込まれ、高く評価できる。また新たな生物遺伝子資源と新規代謝機能を開拓したという点でも、上述の環境科学、生物地球有機化学、資源工学のみならず、農学、環境微生物学、微生物系統分類学、微生物生態学、代謝工学等、幅広い分野に波及効果の高い学術成果であるという点も評価できる。

令和3年1月27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(環境学)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。