

氏名	四方 亜弓		
学位の種類	博士 (生物資源工学)		
学位記番号	博 甲 第 9061 号		
学位授与年月日	平成 31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	バイオコンポストから単離した好アルカリ好熱嫌気性微生物集団ISHI-3によるリグノセルロース分解能に関する研究		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(農芸化学)	小杉 昭彦
副査	筑波大学教授	農学 博士	大井 洋
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	中川 明子
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	野口 良造

論 文 の 要 旨

リグノセルロース系バイオマスから効率的なバイオエネルギー・バイオマテリアル等への変換技術の確立は、持続的社會構築へ向けた重要な開発技術の1つである。リグノセルロース系バイオマスの環境低負荷な前処理法や生物学的糖化技術は、効率的にバイオガスや有機酸製造する上で核となる技術となる。審査対象論文は、稲わらやサトウキビ絞りかすであるバガスなど、リグノセルロース系バイオマスの効率的分解技術の開発を通じ、その分解に関わる嫌気性微生物集団の単離とその構成微生物の特徴について検討、考察を行い、分解に携わる微生物生態を解明したものである。

第一章において、著者は、近年の地球温暖化問題やエネルギー問題を取り上げ、中でもバイオマス有効利用の重要性を説明するとともに、バイオマスの構成成分やその分解を通じて炭素循環における微生物役割の重要性や多様性について研究背景として述べている。

第二章では、微生物多様性の高い堆肥を分離源として、分解困難とされる粉碎バイオマス(トウモロコシ茎葉または稲わら)を含む合成培地に対して、高い糖化能を有する好熱嫌気性微生物集団をスクリーニングしている。本論文では効率的バイオマス分解能を持つ微生物を単離するために、集積培養法を採用し、その結果、安定な微生物ISHIの分離に成功している。さらに限りなく純粋培養に近い状態になるまでロールチューブ法により分離操作を繰り返し、最終的にISHI-3の純粋分離に成功している。著者は、ISHI-3の有能さを示すため、バイオマス分解能を、他同様なセルロース分解菌として知られているクロストリジウム・サーモセラム(*Clostridium thermocellum*)やハービボラックス・サクシノコラ(*Herbivorax saccincola*)の分解能と比較し、ISHI-3がキシラン分解に優れているという特徴を明らかにしている。

第三章においては、ISHI-3の生化学的な知見を深めるため、酵素活性や代謝産物として酸度を測定しISHI-3は単一微生物でないことや、バイオマスそのものを炭素源にすることにより酵素活性や菌体濃度が上昇することを明らかにしている。またISHI-3の微生物構成メンバーを明らかにするため、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)を用い16SrRNA遺伝子のパターンを比較し、4種類の微生物から構成されていることを明らかにした。実際、16SrRNA遺伝子配列から、DGGE法と同様にISHI-3はハービボラックス(*Herbivorax*)、ペトロマキュラム(*Pelotomaculum*)、テピデアナエロバクター(*Tepidanaerobacter*)、テピデマイクロビウム(*Tepidimicrobium*)の4種類の嫌気性微生物で安定的に構成されていることを明らかにした。さらに、ISHI-3の各微生物の役割を明らかにするために、トウモロコシ茎葉又は稲わらを用いた際の、メタゲノム解析を行い、各培養ステージでの微生物分布を明らかにしている。その結果、セルロースやヘミセルロース分解能を示すハービボラックスやペトロマキュラムは、培養初期から中期において優勢的に増殖すると見られ、一方、セルロース非分解菌として知られるテピデアナエロバクターとテピデマイクロビウムは、培養中期から後期にかけて増殖してくることを明らかにした。

第四章では、著者は、微生物それぞれの役割をより明確にするため、ISHI-3から各微生物の単離を試み、テピデアナエロバクター属細菌ET1株およびテピデマイクロビウム属細菌GL4株の純粋分離に成功している。著者は、これらの細菌分離の際に、それぞれの特徴を見極め、炭素源を変えることで純粋培養に成功した。また著者は、これらの嫌気性細菌の糖資化成能や電子顕微鏡の形態学的観察、加えて16SrRNAを基にした分子系統樹解析から、両菌株とも新属新種に分類されることを明らかにしている。ET1株およびGL4株は、酢酸や乳酸やエタノールの資化性が高く、著者が考察している阻害物の変換をしていることを示唆している。最終的に、著者は、ハービボラックスとペトロマキュラム属細菌は、セルロース、ヘミセルロース分解に主に携わっており、テピデアナエロバクターとテピデマイクロビウム属細菌は、分解によって生じた遊離糖や、有機酸などの有機酸を速やかに資化する役割があると結論づけている。また著者は、ISHI-3のバイオマス効率的分解において、単一菌の場合、分解が進むにつれ、遊離糖や有機酸が蓄積し、バイオマス分解酵素が阻害されやすい環境になるが、ISHI-3は、非セルロース分解菌によりその阻害物が消費されるため、単独菌よりもスムーズにバイオマス分解が促進されると考察し本論文を締めくくっている。

以上、著者による実験結果、また微生物生態学的な考察を通じて、著者が単離した微生物集団ISHI-3が、なぜ効率的バイオマス分解を行えるかを、古典的手法である微生物分離同定から最新のマイクロバイオームを使った手法を駆使し、科学的に証明している。本論文で得た知見は将来、効率的で経済性を持つバイオマス分解プロセス構築へ向け基礎的知見として有益であると考えられた。

審 査 の 要 旨

平成 31 年 1 月 22 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（生物資源工学）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。