

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 正一

近年、二酸化炭素、 N_2O と共に地球温暖化の重要な原因ガスとして注目されているメタンは、様々な証拠から微生物によって嫌氣的条件下でも酸化されることが示されているにも関わらず、メタン資化及び酸化の原因になる微生物の単離とその酸化メカニズムは不明である。そこで、本研究では嫌氣的なメタンの資化及び酸化能を持つ微生物を単離し、その嫌氣的メタン酸化メカニズムを明らかにすることを目的にした。まず、2章では嫌氣的メタン酸化能を持つ微生物の単離を行い、メタンの資化性を示す525W株を水田の土壌から単離し525W株と名づけた。本菌は16S rDNAの塩基配列分析による系統解析、Biolog systemを用いた炭素源の資化能解析、Quinone分析、脂肪酸分析、生理学的性質などから*Rhizobium*属に属していることが分かった。本菌は通性嫌氣性菌で、好気培養では*Rhizobium*属とほとんど変わらない炭素資化性を示した。しかし、300mV以下の嫌氣条件下でメタンを唯一炭素源として生育が可能であること、硝酸窒素までの完全脱窒が可能なこと、嫌氣条件下でメタノールの資化性を示すことなど生理学的には既知の*Rhizobium*属とは異なる性質を示しており、*Rhizobium*属の新種であると考えられた。

3章では本菌のメタン資化性を明らかにした。方法としてはGC/C/IRMS (gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometer)を用いた ^{13}C の分析により同位体分別効果を調べた。その結果、培養前後 $67.00 \pm 0.92\%$ から $63.26 \pm 1.05\%$ への約+4‰の ^{13}C シフトが確認され、メタン減少は525W株によるものであることが明らかになった。また、メタンの取り込みは、 $^{12}CH_4$ と $^{13}CH_4$ をそれぞれ唯一炭素源にして培養を行った菌体の ^{13}C 分析により、それぞれ37‰と+55‰の結果が得られ、メタンが炭素源として利用されていることが明らかになった。

4章では本菌の培養法の構築を行った。525W株は生育が遅いため、最適培養条件の検討を行うために培養温度、金属イオン、アミノ酸、ビタミンなどの効果を調べ、メタンを唯一炭素源にする培養条件を決めた。しかしながら、メタンを唯一炭素源にして嫌氣培養を行う場合、生育が非常に遅く世代時間が58時間であり、1ヶ月で培養液1ml当たりの菌数として最大 10^8 個で平均 10^7 個しか得られず、代謝産物探索など生化学実験を開始するには不適合であった。そこで、メタン代謝能を保持した状態の525W株の菌体をより多く得るために様々な培養方法を調べた。その結果、菌の通性嫌氣性の性質を利用し、1段目にyeast extractだけを炭素源とした好気培養により菌体を得、2段目にメタンを唯一炭素源として嫌氣的に培養する、という2段培養を構築した。この方法によって嫌氣的メタン代謝能を有する菌体を大量に得ることに成功した。

5章では本菌の嫌氣的メタン酸化・資化のメカニズムを調べた。525W株は好気条件下ではメタン資化能を示さなかった。さらに、好氣的メタン酸化細菌が有しているmethane monooxygenaseの遺伝子が、525W株においてはPCR法で検出されないこと、methane

monooxygenaseの活性が見られないことから、本菌の嫌氣的メタン酸化経路は好氣的メタン酸化経路とは異なるものであると考えられた。本菌のメタン酸化経路について調べる方法としては、各炭素源での生育性と発生する代謝産物の検索、酵素反応、遺伝子存在確認などによった。結果として、(1)メタンを炭素源にした培養で CH_3NO_2 がメタン依存的に発生することがGC/MS分析で明らかになった。加えて、 CH_3NO_2 を炭素源として 300mV以下の嫌氣条件下で生育が可能であり、ギ酸が代謝産物として CH_3NO_2 依存的に発生することが確認された。なお、ここで確認された嫌氣的な CH_3NO_2 代謝も単離菌としてははじめての例である。(2)各酵素反応を調べた結果として formaldehyde dehydrogenase、*S*-formylglutathione hydrolase、formate dehydrogenaseの活性が認められた。(3)各酵素遺伝子をPCR方法で調べた結果として formaldehyde dehydrogenase、*S*-formylglutathione hydrolase、RubisCOの遺伝子が確認された。以上の結果に基づき、 CH_4 CH_3NO_2 HCHO *S*-formyl-glutathione HCOOH CO_2 Cell massという流れに沿って嫌氣的メタン酸化と資化が起こっていると推定された。

嫌氣的メタン酸化能を持つ菌の単離は本菌がはじめてであり、その酸化メカニズムは現在予測されているメカニズムとは全く異なるものであった。また、本菌の生育モードなどを考慮すると、本菌が自然環境中でも嫌氣的メタン酸化を触媒していると考えられ、今後メタンの新たな流れの解明と温暖化対策に繋がる有意義な知見が得られることが期待された。

以上本論文の知見は学術上ならびに応用上貢献するところ大である。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。