

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加藤 創一郎

自然界、ならびに様々な人工的環境において、ある種の微生物が単独で存在していることはほとんどなく、他の微生物と様々な相互作用を及ぼしあいながら共存していると考えられている。様々な解析手法の発達により、実際の環境中における微生物の生態を解析することが徐々に可能になってきたとはいえ、微生物群集における各菌の果たす機能、さらにはそれら微生物間の相互作用を理解するのは非常に困難であるのが現状である。そこで本研究では高い機能を有し、機能的、構造的に安定なモデル微生物群集（人工生態系）を構築、解析し、微生物群集による効率的機能発揮のメカニズム、および複数種の微生物が安定に共存するメカニズムを解明することを目的とした。

本研究では、堆肥を微生物源として集積培養を繰り返すことにより構築された、50 ℃、好気条件下、静置培養で稲わら、紙などの様々なセルロース物質を効率よく分解することができる安定な微生物群集（original microflora）を実験に用いた。第1章では original microflora から微生物の分離を試み、original microflora で優占種として検出されていた5種全ての細菌（CSK1、FG4、M1-3、M1-5、M1-6 株）を含む、7種の細菌の分離に成功した。唯一のセルロース分解細菌、CSK1 株は既知セルロース分解細菌の *Clostridium thermocellum* に近縁であったが、各種系統分類学試験をおこなった結果、生育至適温度、酸素耐性などの点で相違がみられ、*Clostridium* 属の新種として *Clostridium straminisolvens* と命名、提唱した。CSK1 株は original microflora の培養条件、好気静置培養では生育せず、また嫌気条件下においてもそのセルロース分解効率は非常に低く高効率分解のためには他の非セルロース分解性細菌の寄与が必要であると考えられた。

第2章では CSK1 株と非セルロース分解性分離株との4種混合培養により original microflora と同等の高効率セルロース分解能を有する人工生態系（CSK+M356）を構築した。この解析により、培養液の嫌気化に加えて、分解産物の消費、pH 中性化という作用がセルロース分解の効率化に大きく寄与していることが示された。

第3章では CSK+M356 に PCR-DGGE 解析で優占種として検出されていた FG4 株を加えた5種混合培養により、安定な人工生態系（SF356）の構築に成功した。SF356 とそのロックアウト群集の解析により、各分離株の群集内での機能、役割を推定するに至った。また各混合培養系の継代培養前後における群集構造解析により、各分離株間には様々な関係性、相互作用が存在することが示唆された。

第4章では微生物間相互作用ネットワークに関してさらに詳細な解析をおこなった。安定な人工生態系の構成メンバーの純粋培養系、および2-4種混合培養系の培養過程における各細菌の生育をモニタリングした結果、M1-3 株による M1-5 株の生育抑制といったような、これまでの解析からは見出されていなかった関係がいくつか明らかとなった。また各分離株を他の分離株の培養上清を添加した培地を用いて培養することで、非

セルロース分解性分離株の培養上清による CSK1 株の生育促進効果、好気性分離株の培養上清による他の好気性分離株の生育抑制などが見出された。さらに純粋培養条件、および CSK1 株との混合培養条件における M1-3 株の発現タンパク質を 2 次元電気泳動法により解析した結果、混合培養条件で特異的に発現しているとみられるタンパク質のスポットがいくつか検出され、CSK1 株との相互作用が M1-3 株の生理状態にも影響を及ぼしていることが示された。

以上本論文では、限られたメンバーからなる人工生態系の構築、解析を通して、群集によるセルロースの高効率分解には、非セルロース分解細菌による培養液の嫌気化、pH 中性化、余剰代謝産物の消費、生育促進物質の産生といった働きが、CSK1 株の生育、セルロース分解を促進することが重要であることを示した。またこの群集内には共生や競争、促進や阻害といった、様々なタイプの異種細菌間相互作用が存在していることが示され、このような微生物間ネットワークのバランスがうまく取れていることが複数種の微生物の安定な共存を可能にしていることが示唆された。以上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。