

## 論文審査の結果の要旨

堀 知行

---

申請者氏名

メタンは、拡散状態では温室効果ガスとして働き、濃縮状態ではエネルギー資源ともなる。メタンの大部分が生物活動由来であるため、メタン生成、抑制に関与する微生物は地球上炭素循環やエネルギー生産に影響を与える。応用微生物学的には、大気へと拡散するメタンは生成抑制が目的となり、一方エネルギーメタン産生場ではメタン生成の高効率化が求められる。対象環境により研究の出口は異なるが、メタン生成の代謝過程は同一である。高分子有機物は低級脂肪酸へと変換され、更に共生酸化により酢酸へと分解される。酢酸は、直接メタンへと分解される。また各過程で生じる  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2$  もメタンの前駆物質である。段階的な分解ステップからなるメタン変換は、単一の微生物の代謝では完結し得ず、複数の微生物の相互作用のもと進行する。メタン産生の促進や抑制のためには、嫌気複合微生物系における代謝ネットワークの理解が必要である。本研究では、嫌気廃水処理槽である高温メタン発酵槽と大気中メタンの主要な発生源である嫌気水田土壌に焦点を当て、メタン生成微生物群の環境応答機構・生態生理・微生物間相互作用の解明を試みた。

本論文は、大きく2章からなる。第1章では高温メタン発酵リアクターについて論じた。まず第1節において、微生物群集解析法としてのSSCP法とDGGE法を比較し、SSCP法の方が群集構造のより僅かな変化をとらえることが可能であることを確認した。

第2節では、pH低下・制御による発酵機能変化とメタン生成アーキア群の遷移について、酸性化によって「発酵機能低下期」を、更に中性化によって「回復過程期」を実験室レベルで人為的に創出し、それらに対する微生物群の応答を解析した。その結果、アーキア群が発酵機能変化に応答して推移することが示された。特に *Methanosarcina* は、酢酸濃度の減少時期に選択的に増加したことから、高効率な酢酸分解に関与することが示された。また二種の水素資化性メタン菌の優占性がプロピオン酸の蓄積により入れ替わったことから、これらは槽内の溶存水素濃度を感知してその優占性を決定していることが示された。

第3節においては、有機物負荷変化に対するメタン発酵微生物群の代謝的・構造的応答について検討した。すなわち有機物負荷を変化させることで異なる発酵状態を創出し、微生物群の構造・代謝変化を解析した。その結果、発酵機能の安定化は、二種類以上の微生物群集パターンにより達成され得ることが示された。これにより微生物群集の持つ高い代謝柔軟性が明らかにされるとともに、微生物コミュニティの更なる理解のためには構成微生物の生

態生理・代謝相互作用を明らかにする必要があることが示された。

第4節では、発酵槽内における酢酸共生酸化細菌の生理生態学的知見を得ることを目的として、還元的酢酸生成の鍵酵素である細菌群由来 formyltetrahydrofolate synthetase(FTHFS)遺伝子の多様性と発現プロファイルについて解析を行った。その結果、発酵槽内において FTHFS 遺伝子の発現が確認された。このことと熱力学理論とを併せて考えると、酢酸共生酸化の機能性を強く示唆する。また発現プロファイル解析の結果、主要なホモ酢酸菌のみならず、マイナー種によっても本遺伝子が活発に発現されていることが示された。

第2章では嫌気水田土壌を研究対象とした。第1節では、RNA-SIP を用いて代謝活性のある酢酸同化細菌を同定した。添加した  $^{13}\text{C}$ -酢酸の約 60 %がガスとして回収された。 $^{13}\text{C}$ -酢酸培養系の高密度 RNA 画分で、*Geobacter*、*Anaeromyxobacter* に属する未培養・新規な細菌が優占化した。よって、これらの鉄還元細菌が嫌氣的に  $^{13}\text{C}$ -酢酸を同化していることが示された。さらに実環境においてもこれらの微生物がメタン生成菌と競合関係にあると考えられた。

第2節では土壌に普遍的に存在する主要な結晶性酸化鉄である Ferrihydrite (生物易利用性) と Goethite (生物難利用性) の添加が嫌気酢酸同化細菌に与える影響について、RNA-SIP を用いて解析した。Ferrihydrite 添加系ではメタン生成の著しい抑制が観察され、*Geobacter* が主要な酢酸同化細菌として同定された。Goethite 添加系では *Anaeromyxobacter* や *Rhodocyclaceae* に属する細菌が酢酸同化に関与することが示された。これらにより、鉄還元細菌の鉄(III)利用性の違いによる生理生態学的棲み分けが明らかとなった。

以上、本研究では、地球環境・資源エネルギー問題上極めて重要な二つのメタン生成環境において、微生物群の環境応答機構を明らかにし、更にメタンの最も主要な前駆物質である酢酸に焦点を当て、共生系による酢酸分解と酢酸をめぐって起こるメタン生成菌と嫌気酢酸同化細菌との間の基質競合に関して新規な知見を見出した。これらの知見は、学術上また応用上寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位としてふさわしいと認めた。