

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	大前 公保
論文題目	Genomic and molecular ecological studies on thermophilic hydrogenogenic carboxydrotrophs (好熱性水素生成一酸化炭素資化菌のゲノム解析及び分子生態学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>一酸化炭素 (CO) 資化菌は、CO 脱水素酵素 (CODH) を鍵酵素とする反応を通して CO を増殖に利用する。本菌は CO<sub>2</sub> の還元で得られる CO を炭素源として利用する微生物であるが、CO の酸化でエネルギーを獲得することも知られる。中でも CODH と呼吸型ヒドロゲナーゼ (ECH) の複合体を有する水素生成CO資化菌は、CO 酸化と水素生成を共役させてエネルギーを保存する。そのため、本菌は環境で有毒な CO を除去し水素に変換することから生態学的重要性が指摘される。また、水素生成 CO 資化菌は水素の生成と同時にチオ硫酸や鉄の還元を行うことも知られ、その CO を用いた代謝様式は幅広い。しかし、記載された水素生成 CO 資化菌は陸上温泉を中心に 20 種と限られ、その CO 代謝や、多様性・分布といった生態に関する知見が乏しい。そこで本論文は、新規水素生成 CO 資化菌のゲノム解析による新規 CO 代謝の探索と、本菌の生態解明に向けた分子生態の基盤構築を目的とした。</p> <p>1. 新規水素生成 CO 資化菌 <i>Calderihabitans maritimus</i> KKC1 のゲノム解析</p> <p><i>Calderihabitans maritimus</i> KKC1 は初めて海底堆積物から分離された新属新種の好熱性水素生成 CO 資化菌である。本論文では <i>C. maritimus</i> の CO を用いた代謝様式を解明するために、本種のゲノム解析を行った。de novo ゲノムアセンブリーにより、3,500 個の遺伝子をコードする 3.1 Mbp の本種ドラフトゲノムが構築された。ハウスキーピング遺伝子およびオルソログの相同性に基づいて算出される Genomic similarity score を用いた系統解析により、本種は <i>Moorella</i> 属細菌と根の深い位置から分岐した。本種ゲノム上には原核生物で最も多い 6 個の CODH 遺伝子が認められ、各 CODH はそれぞれが共役すると推測されるタンパク質と同一遺伝子クラスターにコードされていた。その構成遺伝子を調べることで、6 個の CODH の内 3 個は炭素固定、エネルギー保存及び還元力生産を担う既知の CODH であることが明らかになった。一方 <i>C. maritimus</i> KKC1 は、これまで未報告の遺伝子クラスターを構成する CODH を 3 個保有していた。内 1 個は還元的 TCA 回路で CO<sub>2</sub> 固定反応を触媒する 2-オキソグルタル酸酸化還元酵素が上流に認められたことから、CO を CO<sub>2</sub> に酸化した後、TCA 回路を介して固定する、新規な CO 代謝機構を担うと推察された。</p>			

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

## 2. 菌叢解析で参照可能な水素生成 CO 資化菌の網羅的データベースの構築

*C. maritimus* KKC1 のゲノム解析より、水素生成 CO 資化菌の CO 代謝の多様性を理解する上で未知の本代謝菌の探索が重要であると考えられた。本論文では、微生物の多様性を解析する手法として盛んに用いられるアンプリコンシーケンスに着目した。本論文では、一般的な菌叢解析において参照可能な水素生成 CO 資化菌のデータベースを構築した。本解析ではまず、公開データベースに登録されている約 14 万の原核生物ゲノムより、CODH-ECH 遺伝子クラスター保有株を同定し、全原核生物の 16S rRNA 系統における潜在的な水素生成 CO 資化菌の分布を明らかにした。その結果、3 門 17 属 24 種のゲノム上に CODH-ECH 遺伝子クラスターを新たに見だし、潜在的な水素生成 CO 資化菌を 4 門 26 属 43 種まで拡充した。続いて、本データセットから抽出した 16S rRNA 遺伝子配列に、菌叢解析で得られた配列を相同性 98.7% (原核生物の種分類の基準) に基づいてマッピングすることで、環境における潜在的な水素生成 CO 資化菌の分布を解明した。本解析では九州と伊豆の多様な泉源から採取した 100 の堆積物試料を菌叢解析に供し、配列を得た。その結果、54 地点で潜在的な水素生成 CO 資化菌が 13 種見いだされ、中でも Firmicutes 門細菌が 7 属 11 種と最も多く、幅広い泉源に分布することを示した。

## 3. CODH/ECH の CODH 遺伝子を標的とした新規プライマーの設計

菌叢解析で参照可能なデータベースの構築により、世界中の菌叢データを用いて潜在的な水素生成 CO 資化菌を探索することが可能となった。一方で、本手法では既知 26 属 43 種のいずれかと同種と判定されない水素生成 CO 資化菌を評価できない。さらに、CODH-ECH 遺伝子クラスター保有・非保有株が混在する種も報告されていることから、水素生成 CO 資化能を正確に判定できない。そこで本論文では、CODH-ECH 遺伝子クラスターの CODH (CODHech) を直接標的としたプライマーを新たに設計し、新規な水素生成 CO 資化菌も捉えることができる本代謝菌の多様性評価法の確立を試みた。本解析では既知 CODHech 保有株の中でも、最多の 12 属 20 種を含む Firmicutes 門の CODHech を対象に、保存領域を示す近縁な配列を順次選抜し、複数属にまたがって増幅可能な縮合プライマーセットを 6 個設計した。2 地点の泉源より採取した堆積物試料、および本菌を集積するために堆積物を CO 雰囲気下で 5 日間静置した試料を、新規プライマーによるアンプリコンシーケンスに供した。その結果、少なくとも 6 系統の CODHech が検出され、その大半は水素生成を伴う集積培養後に認められた。また、その内 4 系統は既知の水素生成 CO 資化菌の CODHech と近縁であった。したがって本プライマーは集積系内で活動した堆積物由来の水素生成 CO 資化菌を捉えたことが示された。さらに、残りの 2 系統は既知の水素生成 CO 資化菌の CODHech とは明確に異なる系統群を形成した。したがって、本プライマーにより未培養の水素生成 CO 資化菌に由来する CODHech を増幅することに成功した。

(論文審査の結果の要旨)

水素生成一酸化炭素 (CO) 資化菌は、CO 脱水素酵素 (CODH) と呼吸型ヒドロゲナーゼ (ECH) の複合体によって、CO 酸化と水素生成を共役させてエネルギーを保存する。本菌は環境で有毒な CO を除去し水素に変換する生態学的重要性が指摘される。しかし、記載された水素生成 CO 資化菌は陸上温泉を中心に 20 種と限られ、上記の CO 酸化-水素生成共役系とは異なる CO を用いた代謝様式や、多様性・分布といった生態に関する知見が乏しい。本論文は、新規水素生成 CO 資化菌のゲノム解析による新規 CO 代謝の探索と、本菌の生態解明に向けた分子生態の基盤構築を行った。本論文の主な成果は3点に大別できる。

(1) 初めて海底堆積物から分離された新属新種の水素生成 CO 資化菌である *Calderihabitans maritimus* KKC1 のゲノム解析を行った。本種が系統的に新規な細菌であり、CODH/ECH と 2 個の既知 CODH に加え、3 個の新規 CODH を保有することを示した。内 1 個では還元的 TCA 回路の炭素固定との共役が推察され、新規な CO 代謝を明らかにした。

(2) 約 14 万の全原核生物ゲノムに CODH/ECH 保有株を同定し、16S rRNA 遺伝子を抽出することで菌叢解析において参照可能な水素生成 CO 資化菌のデータベースを構築した。新たなものも含め、CODH/ECH 保有株を 4 門 26 属 43 種に見いだした。本データベースを用いて 100 地点の菌叢解析データから潜在的な水素生成CO資化菌を検出し、特に Firmicutes 門が幅広い熱水環境に分布することを示した。

(3) CODH/ECH の CODH を標的とした新規プライマーを設計し、アンプリコンシーケンスで水素生成 CO 資化菌の多様性を高解像度で明らかにする手法を構築した。本手法により、泉源の堆積物から水素生成 CO 資化菌由来の CODH を少なくとも 6 系統検出し、未培養種に由来すると考えられる 2 系統の CODH を見出した。

以上のように、本論文は水素生成 CO 資化菌の CO 代謝、系統的多様性および分布について重要な知見を提供するものであり、微生物学、微生物生態学、ゲノム微生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 1 4 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)