

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	武藤 久
論文題目	Exploring active chemolithoautotrophic microorganisms thriving at deep-sea hydrothermal vent chimney structures in the Mid-Okinawa Trough by using RNA-based microbial community analysis and a new culture method. (中部沖縄トラフ熱水噴出孔チムニーで活動的な化学合成微生物をRNAに基づく微生物群集構造解析と新規培養法によって調査する)		
(論文内容の要旨)			
<p>深海底熱水活動域は、噴出熱水に含まれる化学物質を利用する化学合成独立栄養細菌を基盤とする独自の生態系を育むとともに、噴出熱水中に含まれる高濃度の金属成分は海底に大規模な熱水鉱床を形成することから大きな注目を浴びている。そこで本研究では、熱水活動域微生物の多様性と活動を正確に評価するため、熱水活動域チムニーから微生物RNAを抽出する新たな方法の開発、熱水活動域に生息する化学合成微生物の効率的な分離培養のため、簡便で効果的な平板培養方法の検討、液体培養・平板培養した該当微生物の転写遺伝子解析を実施した。第一章では、本研究の背景と目的を述べている。</p> <p>第二章では、熱水活動域チムニー構造物がRNA抽出に与える影響を評価するため、チムニーの主要な構成鉱物であるパイライトやバライトの粉末と、大腸菌全RNAや大腸菌細胞を混合して回収できるRNAの量や質の変化を測定した。その結果、回収できるRNA量は減るものの、短いRNA断片の増加が見られなかったため、チムニー鉱物へのRNA吸着が起きていることが示唆された。チムニー鉱物へのRNA吸着防止方法を探るため、海底堆積物からの核酸抽出方法を参考にして、複数の方法を試験したところ、リン酸塩の添加によりチムニー鉱物へのRNA吸着が防止できることを突き止めた。そこで、実際のチムニーサンプルからのRNA抽出に同手法を適用し、解析に足る質・量のRNAの抽出に成功した。得られたRNAを解析したところ、熱水活動域チムニーには活動的な<i>Epsilonproteobacteria</i>が高い割合で生息していることが示された。</p> <p>第三章では、特殊なデバイス等を用いない汎用的な平板培養により、深海底熱水活動域に優占する多様な化学合成細菌を培養できるか検討した。様々な条件の中で、特にゲル化剤と気相を工夫することにより、市販のパウチ袋とシャーレを用いた簡便な培養法で、多様な水素/硫黄酸化細菌が固体培地表面にコロニーを形成することを見出した。まずゲル化剤については、ゲランガムを用いた場合のコロニー形成率(コロニー数/塗抹した細胞数)が、寒天のものを大幅に上回った。また気相については、酸素吸収剤とH₂/CO₂混合ガスによるガス置換の併用が効果的であり、特にCO₂ガスの分圧がコロニー形成率に強い影響を及ぼすことを突き止めた。最後に、本研究で最適であると判断されたゲル化剤・気層条件下で深海底熱水活動域に由来する環境試料を培養した結果、<i>Epsilonproteobacteria</i>や<i>Aquificae</i>を含む、これまで液体培養の報告例しかなかった多様な微生物がコロニーを形成した。</p> <p>さらに、熱水活動域に生息する中等度好熱性<i>Epsilonproteobacteria</i>の<i>Nitratiruptor</i> sp. SB155-2株(SB1株)を対象に、培地の状態(液体または固体)、ゲル化剤の種類(ゲランガムまたは寒天)、そして気層中CO₂割合(20または50%)が増殖に</p>			

どのような影響を与えるのかを明らかにするため、各遺伝子の転写解析を行った。液体培地・寒天培地・ゲランガム培地・ゲランガム培地(+CO₂)の4通りの条件で培養したSB1株からRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析に供し、各遺伝子の転写量を比較した。

液体培養と平板培養の比較から、SB1株は液体培養時にはヒドロゲナーゼ、鞭毛関連遺伝子が、平板培地では硫黄酸化遺伝子の発現が向上していることが示唆された。また、異なるゲル化剤で固化した平板培地どうしでの比較（寒天培地とゲランガム培地）では、二成分系や走化性タンパク質といった環境探知・応答に関わる遺伝子およびスルホン酸塩・硝酸塩・炭酸水素塩の輸送に関わる膜輸送体遺伝子の転写量に変動が見られた。これらの結果から、ゲル化剤に対応した平板培地表面の環境、硬さ、保水力、物質移動のしやすさなどによって、平板培地上での増殖が左右されている可能性が示された。また、気層中CO₂ガス割合を変えた条件での比較(ゲランガムとゲランガム+CO₂)では炭素固定(還元的トリカルボン酸回路)に関わる一連の遺伝子にも転写量の変動が見られた。一連の転写解析から、平板培地上での増殖・コロニー形成率の極端な差の原因を突き止める手がかりが得られた。

これらの研究成果は、深海底熱水活動域に生息する新規微生物の単離や、微生物群集の生理・生態を理解する上で重要な知見を提供している。第四章では、本研究の総合討論を述べている。

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)

(論文審査の結果の要旨)

深海底熱水活動域に生息する微生物の多様性・活動を評価するため、チムニー構造物からRNAを抽出する手法を新規に確立した。また、世界中の熱水活動域に普遍的に優占する*Epsilonproteobacteria*や*Aquificae*を含む、化学合成独立栄養微生物の簡便かつ効率的な平板培養法を確立した。さらに中等度好熱性*Epsilonproteobacteria*の比較トランスクリプトーム解析から、培地の状態(液体または固体、寒天またはゲランガム)や気相中CO₂の割合に応じた遺伝子発現が示唆された。これらは深海底熱水活動域に生息する微生物活動の正確な評価、新規微生物の効率的な分離・培養、ひいては深海底熱水活動域の持続的な開発につながりうる成果である。主な成果は以下の3点に大別できる。

- (1) チムニー構造物からのRNA抽出法を確立し、現場環境での微生物活動を評価することを試みた。その結果、チムニー鉱物による吸着がRNA抽出を阻害するが、トリポリリン酸塩の添加で吸着が防がれることを発見し、下流の解析に足る量・質のRNA抽出法を確立した。
- (2) 次に熱水活動域に由来する微生物の新規培養方法として平板培養法の最適化を試みた。ゲル化剤の種類や気相が微生物コロニーの形成率や形成速度に強く影響することを見出した。最適化した条件を用いた環境サンプルの培養では、平板培養された例のない多様な微生物を分離することに成功した。
- (3) 最後に、各培地/培養条件が化学合成微生物に及ぼす影響を遺伝子レベルで探るため、比較トランスクリプトーム解析を実施した。本解析により、平板培地上での増殖・コロニー形成率に影響を及ぼす代謝制御や環境応答に関する重要な知見が得られた。

以上のように、本論文は、深海底熱水活動域に生息する微生物の活動を理解し、その単離や、生理・生態の理解を目指す上で重要な知見を明らかにしたことから、微生物生態学・海洋環境微生物学・海洋分子生態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5年2月13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14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)