

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	西田志穂
論文題目	Studies on microbial diversity of carbon monoxide utilizers in the rare biosphere of aquatic environments (水圏の希少生物圏に潜在する一酸化炭素利用菌の多様性に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>一酸化炭素 (CO) は微生物を含む多くの生物にとって有毒な物質である。しかし、原核生物の中にはCOをエネルギー源および炭素源として利用可能な種が存在しており、CO利用菌と呼ばれる。中でも水素 (H₂) 生成型CO利用菌はCOを鍵酵素であるCOデヒドロゲナーゼ (CODH) によって酸化し、呼吸型ヒドロゲナーゼ (ECH) を用いてH₂を生成する。本菌は環境中での相対存在量が低く、様々な環境から収集したメタゲノムデータにおける探索でも少数しか捉えられないことから、希少生物圏 (rare biosphere) の構成種であると認められるようになった。そのため、環境中に存在するH₂生成型CO利用菌の研究は困難なものである。そこで本研究では従来から用いられてきた環境試料にCOを添加して培養を行うことでH₂生成型CO利用菌を集積し、メタオミクス解析手法を組み合わせることによってrare biosphereの構成種であるH₂生成型CO利用菌の多様性を明らかにしている。第1章では、以上の本研究の背景と目的を述べている。</p> <p>第2章では潜在的H₂生成型CO利用菌由来の高品質なゲノムを獲得するため、環境試料にCOを添加した嫌気性集積培養系 (CO集積培養系) と集積培養試料由来のDNAを用いたメタゲノム解析によって、H₂生成型CO利用菌のmetagenome assembled genomes (MAGs) を構築した。構築された合計32のMAGsの内、5つがCODH遺伝子を含む潜在的CO利用菌由来のゲノムだった。16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析の結果、これら5つのMAGsの内2つはゲノムおよびCO利用能が未報告の <i>Thermolithobacter ferrireducens</i> と最近縁であった。加えてゲノムに基づく系統解析では、これら2つのMAGsは <i>Carboxydocella thermautotrophica</i> 41株と近縁であった。残りの3つのうち、2つのMAGsは古細菌である <i>Geoglobus acetivorans</i> と、最後の1つのMAGは、<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i> DSM 6115株と近縁であった。 <i>T. ferrireducens</i> と最近縁であった2つのMAGsにのみ、CODH-ECH遺伝子クラスターが認められた。これら2つの潜在的H₂生成型CO利用菌のMAGsはCODH-ECH遺伝子クラスターに加えて、CODH遺伝子の周辺にコードされた遺伝子群から炭酸固定およびNAD(P)⁺の還元を介した呼吸に関連した役割を担うと予測されるCODHを含んでいた。さらに、新規なCO利用経路であるシステイン合成に関わると推測されるCODHも有した。本研究によって、2つの高品質な潜在的H₂生成型CO利用菌のゲノムを得ることに成功し、新規なCO利用能と推測される経路を含む複数の経路にCOを利用していることを明らかにしている。</p> <p>第3章では、H₂生成型CO利用菌の分離報告事例が乏しい低温環境での本菌の多様性を明らかにすることを最終目的として、滋賀県琵琶湖第2湖盆湖底堆積物におけるH₂生成型CO利用能の調査と、利用能を有する細菌の推定を試みた。琵琶湖第2湖盆は水深70 mあり、湖底は年間を通じて10℃以下に維持されている。湖底から採取した堆積物試料をCO 20% + N₂ 80%雰囲気下、3本立てで集積培養を行った。48時間培養した結果、すべての集積系でCOの減少とH₂の増加が確認され、琵琶湖湖底にはH₂生成型CO利用菌</p>			

が潜在していることが示唆された。次に集積後の微生物多様性を amplicon sequence variant (ASV) レベルで解析し、潜在的H₂生成型CO利用菌の同定を試みている。3つのCO添加区のうち、2つに共通する1つのASVが既報のH₂生成型CO利用菌 *Carboxydoceella* sp. に分類された。しかし、その他ほとんどのASVsがH₂生成型CO利用菌として報告されていない分類群に属した。本研究で得られた結果から、潜在的H₂生成型CO利用菌の候補となる微生物を含む新規微生物群が琵琶湖湖底に存在する可能性を示している。

第4章では、琵琶湖第2湖盆湖底堆積物からH₂生成型CO利用菌の分離を試みている。CO集積後に平板培地にて画線することにより、B1-2株の分離に成功した。本株は、65℃でH₂生成型CO酸化能を有した。ゲノム解析を行ったところ、本株は *Parageobacillus thermoglucosidasius* と種の閾値を超える99%以上のゲノム相同性を示した。本株のゲノム構造は、主となる染色体に加え、2つの環状プラスミドを含んでいた。またCODH-ECH遺伝子クラスター遺伝子群を有し、本遺伝子群が本株のCO酸化能に寄与すると推察している。本種は、淡水低温環境からの *P. thermoglucosidasius* の初報告であり、低温環境におけるH₂生成型CO利用菌の分布に関する知見を拡充した。

以上のように本論文はH₂生成型CO利用菌の分離・培養の重要性を示し、本菌の分類学的知見とCODHに関する情報資源を拡張した。CO利用菌の代謝と周囲に及ぼす生態学的機能の解明に向けた基礎となると期待され、第5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)

水素 (H₂) 生成一酸化炭素 (CO) 利用菌は、Niを含有した嫌気型COデヒドロゲナーゼ (Ni-CODH) と水素生成ヒドロゲナーゼ (ECH) を用いてエネルギー保存を行う。そのため本菌は、環境においてはエネルギー源の供給者として重要性が指摘され、またCOを除去し高効率に水素を生成する微生物触媒としての応用利用の面でも期待されている。

本研究では、集積培養とオミックス技術を併用し、H₂生成CO利用能を有する未記載種の分離探索を推進し、本菌の多様性を解明することを目的としており、主な成果は次のとおりである。

1. 熱水底泥試料をCO雰囲気下で集積培養し、メタゲノム解析に供することにより高品質なCO酸化菌MAGの構築に成功した。すなわち本集積培養系によりCO利用菌が効果的に集積され、分離培養株の確立に至らなくとも、遺伝情報を得てその系統や性状を明らかにすることが可能な基盤技術として極めて有用であることが示した。
2. 琵琶湖湖底堆積物試料からCOによる集積培養の構築に成功し、低温環境にH₂生成型CO利用菌が潜在していることを明らかにした。
3. 琵琶湖湖底堆積物試料からH₂生成型CO利用能を有する *Parageobacillus thermoglucosidasius* の分離・ゲノム性状解析に成功し、本菌の低温環境における分布に関する知見を拡大した。

以上のように、集積培養とオミックス解析により環境では希少な微生物種を効果的に集積させ、遺伝情報を得てその系統や性状を解明する手法が水圏希少微生物圏研究の基盤技術として極めて有用であることを示し、水産学・微生物学および微生物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6年1月18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）