

## 論文の要旨 (4000 字)

題目     メタン生成・消費微生物の培養から紐解く未知の炭素循環  
(Enrichment of methane-related microorganisms to reveal unknown carbon cycles)

氏名     蒲原 宏実

メタンは、二酸化炭素の 28 倍もの温室効果能を持つ強温室効果ガスである。近年の地球温暖化が原因とされる異常気象は、人類の生活を脅かしており、二酸化炭素に加えてメタンの動態が注目されるようになってきた。このような背景において、我々は、メタンの生成・消費に関与する微生物の研究を進めている。自然界には、メタンを生成する微生物と消費する微生物の存在が知られている。メタンの大気中の濃度は年々増加しており、この増加は、微生物によるメタンの生成がメタンの消費を上回った結果だと考えられる。これまで、メタン消費は Proteobacteria 門に属する微生物グループが行うと考えられていたが、最近では、他の系統の微生物もメタン消費に関与することが分かってきた。一方、メタンは微生物による有機物の分解によって生成されるものとされてきたが、最近のフィールド調査の結果から、有機物が枯渇した環境でもメタン生成が示唆されている。このようにメタン生成・消費について、未知の微生物・微生物反応が存在している。本論文では、様々な条件のもとでメタン関連微生物を培養する中で見出された新規メタン関連微生物・反応について取りまとめた。

本論文は、第 1 章「序章」から第 8 章「総括」までの全 8 章から成る。

第 1 章「序章」では、本研究の背景となるメタンを取り巻く近年の社会情勢を示した。また、そのメタンと微生物との関わりについて述べ、本研究で明らかにする未知の炭素循環を示し、本論文で取り組む研究の位置付けを行った。

第 2 章「既往の知見」では、既知のメタン消費・メタン生成微生物に関する一般的な特徴から最近の研究動向について整理した。これまでに分離されたメタン消費微生物を整理し、近年発見された特徴ある微生物について、その生息地や検出方法を示した。メタン消費に関与する酵素に関しても、その種類と特徴を整理することで、分離された微生物の基質特性を関連付けた。また、従来のメタン消費経路と、近年提案されているメタン酸化経路とを比較した。メタン生成においては、これまでの行われてきた研究手法や提唱されているメタン生成モデルを示した。

第 3 章「メタン酸化細菌のコミュニティーに影響を与える環境因子」では、Proteobacteria 門に属するメタン酸化細菌をメタン濃度、アンモニウム濃度、pH が異なる 38 条件で培養した研究について記載した。メタン酸化細菌は系統的にタイプ I とタイプ II に大別される。これまでにメタン酸化細菌の優占タイプを決定する環境因子には、メタン、アンモニウム、pH などが提案されてきたが、ほとんどの研究では個別の因子に着目しており、統一的な見解が示されていなかった。第 3 章では、優占タイプに関与する環境因子を明らかにするために、連続式リアクターを用い、様々な条件でメタン酸化細菌の培養を実施した。全てのリアクターでメタン

酸化細菌の培養に成功し、優占タイプは pH によって支配されていることが分かった。また、*Mycobacterium* 属が新規メタン酸化細菌グループである可能性を見出した。

第4章「高濃度アンモニウム環境で活躍するメタン酸化細菌」では、4基のリアクターを用いてメタン酸化細菌を培養した研究結果について記載した。第3章で、アンモニウム濃度が高い環境では、従来報告されているメタン酸化細菌に代わって *Mycobacterium* 属細菌がメタンを消費していることが示唆された。*Mycobacterium* 属は、従来、メタン酸化細菌グループとは考えられていない。*Mycobacterium* 属がメタン酸化細菌グループであるか調査するためにアンモニウム濃度が高い条件、低い条件、pH 4 および 7 の計 4 条件でリアクターを運転した。アンモニウム濃度が高く、pH 4 の条件では、メタン酸化が確認されたにも関わらず、既知のメタン酸化細菌は検出されず、*Mycobacterium* が優占化していた。このことから、アンモニウム濃度と pH が *Mycobacterium* 属細菌の培養条件として重要であることが分かった。しかし、分離培養には至っておらず、今後はこの細菌を分離培養する必要がある。

第5章「低濃度メタンを利用するメタン酸化細菌」では、低濃度メタンを供給したリアクターを用いてメタン酸化細菌を培養した研究結果について記載した。第3章では、低濃度 (100 ppm) で培養した系では、メタン酸化細菌が検出されなかったことに着目し、低濃度メタン環境で増殖するメタン酸化細菌の集積培養を目的として実験を行った。先行研究の結果から、酸性条件では低濃度メタンでも増殖する微生物の存在が示唆されている。そこで、本研究では、酸性条件で低濃度メタン (10 ppm) を酸化する微生物の培養を行なった。今回、低濃度メタン (10 ppm) を消費する微生物の培養には成功したものの、低濃度メタンを利用して増殖する反応を確認することはできなかった。低濃度メタンを資化して増殖する微生物の存在を明らかにするために、リアクターを用いて目的の微生物を集積培養するとともに、そのバイオマスを用いた分離培養実験の実施や、集積培養系バイオマスに対するメタゲノム解析の実施によって、培養条件・分離条件の検討が必要である。

第6章「マンガン還元メタン酸化古細菌 ANME 集積培養の試み」では、スポンジ担体にマンガン酸化物を塗布してメタン酸化古細菌 ANME の集積培養を目的として運転したリアクターの結果を記述した。ANME は嫌気条件下でメタンを酸化する古細菌であり、本研究では電子受容体にマンガン酸化物を利用する微生物の集積培養を目指した。マンガン酸化物を塗布していない系では、メタン酸化は起こらなかったが、マンガン酸化物を塗布した系ではメタン消費が確認された。しかし、本リアクターには酸素はほとんど供給されていないにも関わらず、遺伝子結果から、ANME ではなく好気メタン酸化細菌が培養されたことが分かった。微量な酸素が存在すると、好気メタン酸化細菌がメタノールを生成し、そのメタノールを金属還元微生物が利用することで、メタンが消費されたのかもしれない。このことから、低濃度酸素環境において、ANME の培養が困難であることが示唆された。今後は ANME の培養条件の検討と、低濃度酸素条件におけるマンガン酸化物存在下での好気メタン酸化細菌によるメタン酸化プロセス解明のための研究を行う必要がある。

第7章「CO<sub>2</sub> からのメタン生成と硫化水素除去のための新規微生物電気合成システム (MES)」では、低電圧下で無機物からメタンを生成させるための微生物電気合成システム (MES) を用いたバッチ実験結果について記述した。本研究では、HS 酸化をカップリング反応とした生物学的メタン生成を 0.2 V という低電圧下で証明した。そして微生物解析の結果から、メタン生成と硫黄酸化反応に関与する微生物も明らかにし、電子の

流れを含めたメタン生成・硫黄酸化モデルを提案した。また、本 MES は、エアレーションを用いない環境配慮型の新たな生物学的な脱硫システムに適用されうる。さらに、この MES は脱硫だけではなくエネルギー資源であるメタンも同時に回収できる点でも優れている。しかしながら、このメタン生成に関与した微生物のほとんどは未培養である。このプロセスを実用化するためには、微生物の分離培養を含めた更なる研究が必要である。

第 8 章「総括」では、本研究で明らかにした炭素循環に関与する微生物やその反応について取りまとめた。また、これらの研究に関する展開や応用について示した。

本研究では、様々な環境でメタン関連微生物の培養を行った。その中で、既知のメタン酸化細菌・古細菌やメタン酸化反応、メタン生成反応とは異なる微生物群や、反応の存在を明らかにすることができた。本研究の結果は、メタンの動態を把握する上で、非常に重要な知見である。

一般的にはメタン酸化が阻害される高アンモニウム環境下や、好気メタン酸化細菌が働きにくいと考えられていた低酸素環境においても、酸性条件、マンガン酸化物存在下などの条件を与えることで、従来とは異なる微生物・微生物反応により、高いメタン酸化能力が発揮されることが分かった。

しかし、残された課題も多い。本研究では、微生物の分離や、未知のメタン酸化・メタン生成プロセスのメカニズムを実証することができていない。今後は、メタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析によって、反応のメカニズムを予測することや、微生物の分離によって、その微生物の働きを明らかにしていくことが必要である。

本研究の知見は新規環境技術の確立に向けて非常に有用な情報である。例えば、産業分野において未利用の発熱量は多く、この排熱を利用することで、メタン生成に必要な電圧を供給することができるかもしれない。また、排水処理プロセスにおいて、有効利用されなかったメタンは余剰ガス燃焼装置でエネルギーをかけて燃やされているが、これを生物的処理に置き換えることも可能で、低濃度メタンを利用する微生物を用いれば、エネルギーをかけずとも大気中へ放散されるメタンは限りなく 0 にすることも可能である。

本研究で得られた知見は、生物学的に工学的にも有用な知見であり、生物学の発展とカーボンニュートラルな社会の実装へ貢献することを期待する。