

【学位論文審査の要旨】

1 研究の目的

アンモニアはタンパク質や核酸の合成に関わる窒素化合物で生物に必須の化合物であるばかりでなく、近年では二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーとしても注目されている。地球生態系において窒素循環の理解は環境・生態系保全に重要となっている。環境中で微生物はその窒素循環の要として機能しており、古くから幅広い研究が行なわれてきた。それらの知見は、生命の誕生・進化の解明や廃水処理技術の開発にも活用されている。

窒素化合物を還元してアンモニアを生産する嫌気微生物および好気微生物は広い環境からみつき、多様な系統の微生物がその反応に関わることが知られるようになっている。一方、アンモニアを酸化し電子源とする微生物についての知見はまだ限られている。好氣的にアンモニアを酸化する微生物は多様な環境から見つかるようになったが、その微生物種は一部の系統群に限られる。また嫌気環境におけるアンモニア酸化微生物については、不明な点が多く残されている。嫌氣的アンモニア酸化反応の存在は、50年以上前から理論的に予想されていたが、最初にその反応が見つかったのは1990年代になってからであるが、未だにその微生物は分離培養されていない。また、その反応には、好気環境でアンモニアから生成される亜硝酸を必要とすることから、完全に嫌氣的な条件でアンモニアを酸化する微生物反応はみつかっていない。本論文では、嫌氣的にアンモニアを電子源として生育できる微生物を探索し、それらを分子系統学的、代謝学的、生理・生化学的、遺伝学的に特徴づけることを目的とした。

古くからの熱力学的考察から、硫酸を呼吸に利用する硫酸還元細菌、光エネルギーを化学エネルギーに変換できる光合成細菌、がアンモニアを嫌氣的に参加できると予想されていた。またそのような微生物は地球誕生のころの高温環境に生存していたと考えられる。そこで本論文では、陸上温泉に分布する好熱性細菌に注目し、アンモニアを電子源に生育できる硫酸還元細菌および光合成細菌に注目し、全く未知であった嫌氣的アンモニア酸化反応を発見する、という、挑戦的な課題に取り組んだ。

2 研究の方法と結果

未発見微生物の宝庫と言われる50°Cを超える温泉土壌を採取し、アンモニアを電子源に利用できる硫酸還元細菌を探索した。また光合成生物の祖先と言われているクロロフレクサス属の好熱性光合成細菌を多数収集し、未発見の代謝能力を調査した。

(1) アンモニア酸化硫酸還元細菌の分離とその増殖特性

本研究では、宮城県鬼首温泉からアンモニアを電子源とした無機培地で生育できる細菌をスクリーニングし、好熱性硫酸還元細菌を分離培養することに成功した。その分子系統学解析から、*Thermodesulfomicrobium* 属に属すると考えられた。本菌の代謝・生理学的特性を評価し、増殖に伴いアンモニアと硫酸が減少することを見出し、またそれに伴い硫

化水素を生成したことから、本菌が硫酸呼吸を利用してアンモニアを酸化していると考えた。しかし、アンモニアの酸化産物として予想される窒素化合物はいずれも検出されていない。減少する硫酸濃度から推定される濃度の硫化水素が生成していないことから、アンモニア酸化産物は硫化水素と反応し培養系から失われている可能性が高い。よって反応性の高い一酸化窒素が産物の有力な候補であると考えられる。アンモニアを一酸化窒素に参加する反応はこれまでにみつかっておらず、全く新規の代謝経路を有することが予想される。本菌のゲノム情報も取得・解析しており、生物の多様化を知るうえでも興味深い知見を提供している。

(2) アンモニア酸化光合成細菌の探索とその増殖特性

陸上温泉から見出されていた複数系統のクロロフレクサス属細菌を収集し、アンモニアを電子源とした生育が認められるかを丹念にまた注意深く評価した。クロロフレクサス属細菌には、これまでに無機電子源として硫化水素や水素ガスの利用性が報告されているが、その利用性は株レベルで異なることが分かっている。本論文で試験した5株のクロロフレクサス属細菌はアンモニアを唯一の電子源とした培養条件で増殖能を示したが、それらのなかで安定な生育を示したのは1株のみであった。この1株を中心にその生育特性を解析し、アンモニアは窒素源以外として利用されていること、ガス状の窒素化合物や硝酸、亜硝酸が検出されないこと、一酸化窒素除去剤によって生育が促進されること、などから本菌がアンモニアを電子源として利用していると結論付けている。ゲノム情報の解析から、その代謝経路を推定する試みもあったが、残念ながら、経路の同定には至っていない。このことは既知遺伝子・タンパク質情報からは推定できない全く新規の代謝酵素・経路を有することを示唆している。これらの大きな発見に導けた要因は、これまでの慣用的な培養法や条件を見直し工夫して、また小さなヒントを見落とすことなく注意深く観察を続けてきたことにある。本成果は生物の進化・多様化を知るうえでも興味深い発見である。

本論文では、これらの成果を二つの章に分けて関連論文を引用しながら明確に記述するとともに、新規性、意義や今後の展望を総合的に論じている。

3 審査の結果

本論文では、微生物の嫌氣的なアンモニア消費反応を全く新たに二種類発見した。本反応は長年、理論的に予想されていたながら未発見であったが、生物および生態系にとって最も重要な窒素代謝のひとつであり、丹念な培養実験、生理・生化学実験、遺伝子解析およびバイオ情報技術を駆使して解明した本論文の成果は、特に高く評価できる。また古地球で初期生命が無酸素下でアンモニアを如何にエネルギー源にしてきたのかを探るうえでも非常に興味深い成果である。近年、アンモニアは水素エネルギーキャリアとしても注目されており、本論文で発見した反応は、地球生態系の形成・維持を支える窒素循環を知るだ

けでなく、産業への応用利用性もあり、大きな意義を持つ。本論文の内容の一部は、すでに英文学術雑誌に審査のうえ受理されており、残りの部分も、今後公表されるに十分値する内容を含んでいる。よって、本論文は博士（理学）の学位に十分値すると判定した。

4 最終試験の結果

本学の学位規則および生命科学専攻内の申し合わせに従って最終試験を行った。公開の席上で論文内容を発表し、生命科学専攻教員による質疑応答をもって論文内容および関連分野についての最終試験とし、合格と判定した。