

審査の結果の要旨

氏名 野口 愛

本論文は、「メタン生成条件におけるベンゼンの分解微生物種と初発代謝経路の解析」と題したもので、嫌氣的な条件下でベンゼンを分解する微生物集積培養系において、ベンゼン分解に関与する微生物の解析を行ったものである。都市の環境問題として、地下水・土壌汚染は極めて重要であるにもかかわらず、その浄化が迅速には行われていない。その大きな理由として、汚染浄化のコストがある。生物学的浄化技術であるバイオレメディエーションは、一般に物理化学的浄化技術にくらべ低コスト・低エネルギー型の浄化技術である。このことから、バイオレメディエーションの研究開発は極めて重要な課題である。

土壌・地下水汚染の原因物質のなかでも、ベンゼンは代表的な物質であり、2007~2010年の環境基準の超過件数は揮発性有機化合物類の中で一番多くなっている。ベンゼンは好気条件下では容易に微生物による分解を受けるものの、嫌気存在下では比較的安定である。これまで、硝酸還元条件下や鉄還元条件下において、ベンゼンを分解する微生物については数件の単離例が報告されており、ベンゼン分解菌に関する情報が得られている。一方、酸化還元電位のより低い硫酸還元条件下やメタン生成条件下においてベンゼンを分解する微生物については未だ純粋分離の報告はなく、その分解経路に関する報告も推定にとどまっている。土壌地下水汚染浄化技術として嫌氣的ベンゼン分解の技術を確立するためには、硫酸還元やメタン生成条件においても、ベンゼン分解に関与する微生物を特定し、ベンゼン分解を制御するための手法を確立していく必要がある。

本論文では、メタン生成条件下におけるベンゼンの初発代謝を担う微生物の解明を目的とし、ベンゼン分解集積培養系の微生物群集構造の特徴を把握するとともに、¹³C-ベンゼンを用いた安定同位体プローブ法によりベンゼン分解の初発代謝を行っている菌の同定を行っている。さらに、推定されている初発代謝産物(トルエン・フェノール・安息香酸)を用いた安定同位体プローブ法を用いることで、これらの初発代謝分解菌を特定するとともに代謝経路の推定を行っている。本論文は、以下の7章で構成されている。

第1章では研究の背景と目的を述べている。

第2章ではベンゼンの嫌氣的微生物分解について既存の知見をまとめている。

第3章では本論文で用いられた実験・解析手法をまとめている。

第4章では、次世代高速塩基配列解析法により、メタン生成条件ベンゼン分解集積系の群集構造解析を行っている。本手法を用いることで微生物群集構造の定量的な比較が可能となっている。ベンゼンのみを炭素源として嫌気条件下で3年以上培養した5つの集積系の16S rRNA遺伝子を対象として解析したところ、すべてにおいて*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*が主要な門として検出され、その比率も類似していたとしている。集積前に検出された16S rRNA遺伝子配列のOTU (operational taxonomic unit)の延べ数が集積後には約半分になっていたのに対し、5つの集積系で共通して検出されたOTU数は約1.5倍になっていたことから、嫌氣的にベンゼンを与え続けるという条件が菌叢の比率に変化をもたらし、メタン生成ベンゼン分解集積系の微生物群はある構成に類似していくことを示している。

第5章ではメタン生成ベンゼン分解集積系におけるベンゼン分解菌の特定を目的とし、安定同位体プローブ法を用いた解析を行っている。本章では、メタン生成条件でベンゼンを分解する微生物を安定同位体標識したベンゼンを用いて3種の集積系に適用した結果、3つの集積系で*Deltaproteobacteria*綱に属し*Desulfobacterales*目に近縁な細菌が ^{13}C を資化していたとしている。また、そのうち2つの系では*Coriobacteriaceae*科類縁菌も共通して検出されている。さらに経時的な解析を行った結果、これらの菌が最も早い時期にベンゼン由来の ^{13}C を資化していたことから、ベンゼン分解へ寄与している可能性が最も高いと結論している。

第6章ではメタン生成ベンゼン分解集積系がその他の芳香族化合物を分解可能であるかを検証し、各系で起こっているベンゼン分解の経路を推定している。ベンゼンの推定初発代謝産物の分解試験では、安息香酸と比較してトルエン、フェノールの分解速度は非常に小さかった。トルエン、フェノール、安息香酸分解に対して安定同位体プローブ法を適用している。トルエン、フェノール系ではベンゼン分解微生物とは異なる微生物が ^{13}C の取り込みを行っていた。一方で、安息香酸分解系ではベンゼン分解微生物として検出された*Desulfobacterales*目近縁細菌とは系統学的に近いものの異なる微生物と、*Clostridiaceae*科の細菌の安息香酸由来の炭素の取り込みが示された。さらに、ベンゼン分解の際に検出された*Coriobacteriaceae*科細菌が安息香酸分解に関与していることが示されている。よって、*Coriobacteriaceae*科細菌においては安息香酸を経由するベンゼン分解が行われている可能性が高いことが示されている。また、*Desulfobacterales*目近縁細菌のベンゼン分解においても、トルエン、フェノールの分解速度と安定同位体プローブ法の結果も合わせて、安息香酸あるいはBenzoyl-CoAを経由して分解されている可能性が最も高いとしている。

第7章では結論と今後の展望について述べている。本研究では、1) メタン生成ベンゼン分解系は極めて類似した微生物群集構造をしていること、2) 複数の集積培養系で*Desulfobacterales*目近縁細菌と*Coriobacteriaceae*科細菌が主にベンゼン由来の ^{13}C の資化をしていること、3) ベンゼンが安息香酸あるいはBenzoyl-CoAを経由して分解されている可能性が最も高いこと、が明らかとなったとしている。

メタン生成条件におけるベンゼン分解はいまだにその制御法が確立されておらず、世界

的にも2、3の研究グループのみでしか研究がおこなわれていない。しかしながらベンゼン汚染土壌・地下水の浄化技術として開発していくためには、ベンゼン分解微生物の特定と、その制御は必須である。本研究では、複数のベンゼン分解集積培養系に対して、詳細にベンゼン分解微生物の解析を行っている。現在用いることのできる分子生物学的な手法を駆使しても、ベンゼン分解微生物を完全に特定することはできないが、本研究では現状で可能な限りベンゼン分解微生物の特定に近づいているといえる。得られている結果はきわめて新規性が高く、今後の汚染土壌・地下水の浄化技術の開発に向けて端緒をつけるものである。さらに本研究成果は工学的な重要性のみならず、微生物生態学においてもメタン生成条件におけるベンゼン分解の機構解明に向けて、大きな意義をもつものである。以上のような観点から、本研究は都市環境工学の学術の発展に非常に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。