

学位論文題名

Effect of temperature on anaerobic degradation process
of organic matter in coastal marine sediment

(沿岸海洋堆積物における嫌氣的有機物分解過程に対する温度の影響)

学位論文内容の要旨

海洋堆積物は陸上や海洋表層で固定された炭素の貯蔵庫としての役割を担っている。年間で海底に堆積する有機物量は約 0.1 Gt y^{-1} であるが、堆積した有機物は微生物によって分解され CO_2 として放出される。水深が 200 m より浅い大陸周辺の沿岸域は全海洋面積の 7% を占めるにすぎないが、無機化の約 90% が行われていると考えられている。沿岸堆積物表層においては、外来性および現場で生産された大量の有機物が好氣的な分解を受け、この過程において酸素が消費される。拡散による供給が制限される堆積物の内部では酸素が枯渇し、嫌氣的環境が発達する。嫌氣的条件では、堆積した高分子有機物（多糖類やタンパク質など）は直接 CO_2 まで分解されず、加水分解や発酵によって低分子有機物（単糖類やアミノ酸など）に分解される。低分子有機物はさらに発酵や硫酸還元によって分解され、安定な酢酸まで分解される。海水には硫酸塩が約 28mM 含まれており、海洋堆積物中における酢酸無機化過程の主要な担い手は硫酸還元菌となるが、酢酸を分解できる硫酸還元菌の種類は限られている。このように堆積物中の有機物の分解は加水分解、発酵、硫酸還元の各過程が連続して進行するが、これらの過程はそれぞれ別の微生物群によって行われる。これらの反応に関わる微生物種は温度等の環境条件に対する応答性がそれぞれ異なっており、全体としての嫌氣的分解過程は複雑で未解明な点が多い。そこで本論文では、沿岸域での有機物分解過程と温度による影響について明らかにすることを目的とした。

有機物の嫌氣的分解過程への温度の影響を室内実験により解明した。季節的に温度が変動する温帯海洋沿岸堆積物のモデルとして東京湾三番瀬干潟堆積物を用いて、硫酸還元菌が直接利用できないセロビオース（二糖類）を嫌氣的分解する硫酸還元集積培養系を各種温度（3、8、13、18、23、28℃）で確立した。集積培養液中の硫化物、溶存態有機炭素および有機酸の濃度変化から、有機物分解過程を追跡した。その結果、分解のパターンは 3 つの温度帯、すなわち 1) 3℃系、2) 8/13℃系、3) 18/23/28℃系の間で大きく異なることが明らかとなった。3℃系以外では、有機物分解は二段階で進行した。第一段階では、有機物は加水分解、発酵と硫酸還元によって消費されていた。第二段階では、第一段階で蓄積した酢酸が硫酸還元によって完全分解されていた。しかし、8/13℃と 18/23/28℃では二段階目の分解が進行するまでの停滞期間の長さに著しい差があった。また、3℃系では第二段階に相当する酢酸分解過程が確認できなかった。各培養系における微生物群集を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE 法）により解析した結果、8℃以上で認められた酢酸分解過程において酢酸分解硫酸還元菌である *Desulfobacter* 属に近縁な配列が検出された。停滞期間の異なる 8/13℃と 18/23/28℃では、検出された *Desulfobacter* 属の種が異なっていた。各温度での有機物分解の進行の違いには、*Desulfobacter* 属の種間での生理学的特性の違いが大きく関与していることが示唆された。これらの結果は、酢酸分解硫酸還元菌の温度特性が、沿岸海洋堆積物中の有機物分解速度の温度変化への応答性を決める可能性を示している。

DNA を対象とした解析により、集積培養系での有機物分解の各過程に関わる微生物群を推定することができた。しかしながら、微生物の多くは環境条件によって代謝経路を切り替えるため、存在する微生物の種類のみから分解過程の全てを明らかにすることは困難である。

これを解決するためのひとつのアプローチとして、集積培養系内に存在する全タンパク質を網羅的に検出するメタプロテオーム解析を行い、有機物の分解過程を酵素レベルで記述することを試みた。現状ではタンパク質の同定にはゲノム情報が必要となるが、集積培養系から検出された微生物のゲノム配列は明らかとなっていない。本研究では、ゲノム情報の無い細菌に対して近縁種のゲノム情報を利用して解析を行い、こうした手法の有用性と問題点について検証した。硫酸還元条件下でのセロビオースの分解過程を追跡するため、加水分解と発酵が起こっている期間、酢酸以外の有機酸が硫酸還元によって分解されている期間、酢酸の分解が起きている期間からそれぞれ細胞を回収し、全タンパク質を抽出した。近縁種のデータを利用したタンパク質同定の結果、各種有機物の分解および生成に関わる酵素が各物質の消長に応じた形で検出された。一方、プロピオン酸分解酵素や酢酸分解経路の一部のタンパク質など、利用したゲノム情報中に当該遺伝子が含まれていないものは原理上解析が不可能であった。ゲノム情報の不足が解析の制限となることが確認され、今後のデータベースの拡充が重要である。この実験により、複合系での有機物分解経路を解析するうえでのプロテオーム解析の有用性と問題点を整理することができた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	福井	学
副査	教授	森川	正章
副査	准教授	笠原	康裕
副査	助教	小島	久弥

学位論文題名

Effect of temperature on anaerobic degradation process of organic matter in coastal marine sediment

(沿岸海洋堆積物における嫌氣的有機物分解過程に対する温度の影響)

海洋堆積物は陸上や海洋表層で固定された炭素の貯蔵庫としての役割を担っている。年間で海底に堆積する有機物量は約 0.1 Gt y^{-1} であるが、堆積した有機物は微生物によって分解され CO_2 として放出される。水深が200 mより浅い大陸周辺の沿岸域は海洋面積の7%しかないにもかかわらず、無機化の約90%が行われていると考えられている。沿岸堆積物表層においては、外来性および現場で生産された大量の有機物が好氣的な分解を受け、この過程において酸素が消費される。拡散による供給が制限される堆積物の内部では酸素が枯渇し、嫌氣的環境が発達する。嫌氣的条件では、堆積した高分子有機物（多糖類やタンパク質など）は直接 CO_2 まで分解されず、加水分解や発酵によって低分子有機物（単糖類やアミノ酸など）に分解される。低分子有機物はさらに発酵や硫酸還元によって分解され、安定な酢酸まで分解される。海水には硫酸塩が約28mM含まれており、海洋堆積物中における酢酸無機化過程の主要な担い手は硫酸還元菌となるが、酢酸を分解できる硫酸還元菌の種類は限られている。このように堆積物中の有機物の分解は加水分解、発酵、硫酸還元の各過程が連続して進行するが、これらの過程はそれぞれ別の微生物群によって行われる。これらの反応に関わる微生物種は温度等の環境条件に対する応答性がそれぞれ異なっており、全体としての嫌氣的分解過程は複雑で未解明な点が多い。そこで本論文では、沿岸域での有機物分解過程と温度による影響について明らかにすることを目的とした。

有機物の嫌氣的分解過程への温度の影響を室内実験により解明した。季節的に温度が変動する温帯海洋沿岸堆積物のモデルとして東京湾三番瀬干潟堆積物を用いて、硫酸還元菌が直接利用できないセロビオース（二糖類）を嫌氣的分解する硫酸還元集積培養系を各種温度（3、8、13、18、23、28℃）で確立した。集積培養液中の硫酸塩、硫化物、溶存態有機炭素および有機酸の濃度変化から、有機物分解過程を追跡した。その結果、分解のパターンは3つの温度帯、すなわち1) 3℃系、2) 8/13℃系、3) 18/23/28℃系の間で大きく異なることが明らかとなった。3℃系以外では、有機物分解は二段階で進行した。第一段階では、有機物は加水分解、発酵と硫酸還元によって消費されていた。第二段階では、第一段階で蓄積した酢酸が硫酸還元によって完全分解されていた。しかし、8/13℃と18/23/28℃では二段階目の分

解が進行するまでの停滞期間の長さに著しい差があった。また、3℃系では第二段階に相当する酢酸分解過程が確認できなかった。各培養系における微生物群集を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE法）により解析した結果、8℃以上で認められた酢酸分解過程において酢酸分解硫酸還元菌である*Desulfofacter* 属に近縁な配列が検出された。停滞期間の異なる8/13℃と18/23/28℃では、検出された*Desulfofacter* 属の種が異なっていた。各温度での有機物分解の進行の違いには、*Desulfofacter*属の種間での生理学的特性の違いが大きく関与していることが示唆された。これらの結果は、酢酸分解硫酸還元菌の温度特性が、沿岸海洋堆積物中の有機物分解速度の温度変化への応答性を決める可能性を示している。

DNAを対象とした解析により、集積培養系での有機物分解の各過程に関わる微生物群を推定することができた。しかしながら、微生物の多くは環境条件によって代謝経路を切り替えるため、存在する微生物の種類のみから分解過程の全てを明らかにすることは困難である。これを解決するためのひとつのアプローチとして、集積培養系内に存在する全タンパク質を網羅的に検出するメタプロテオーム解析を行い、有機物の分解過程を酵素レベルで記述することを試みた。現状ではタンパク質の同定にはゲノム情報が必要となるが、集積培養系から検出された微生物のゲノム配列は明らかとなっていない。本研究では、ゲノム情報の無い細菌に対して近縁種のゲノム情報を利用して解析を行い、こうした手法の有用性と問題点について検証した。硫酸還元条件下でのセロビオースの分解過程を追跡するため、加水分解と発酵が起こっている期間、酢酸以外の有機酸が硫酸還元によって分解されている期間、酢酸の分解が起きている期間からそれぞれ細胞を回収し、全タンパク質を抽出した。近縁種のデータを利用したタンパク質同定の結果、各種有機物の分解および生成に関わる酵素が各物質の消長に応じた形で検出された。一方、プロピオン酸分解酵素や酢酸分解経路の一部のタンパク質など、利用したゲノム情報中に当該遺伝子が含まれていないものは原理上解析が不可能であった。ゲノム情報の不足が解析の制限となることが確認され、今後のデータベースの拡充が重要である。この実験により、複合系での有機物分解経路を解析するうえでのプロテオーム解析の有用性と問題点を示した。

審査委員一同は、これらの成果を評価し、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受ける資格を有するものと判定した。