



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Novel syntrophy driven by methylotrophic methanogens [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	HUANG, YAN
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15147号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87196
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Huang_Yan_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏名	Huang Yan
審査担当者	主査	客員准教授	加藤 創一郎
	副査	教授	吹谷 智
	副査	客員教授	鎌形 洋一
	副査	教授	曾根 輝雄（国際食資源学院）
	副査	客員准教授	北川 航

学位論文題名

Novel syntrophy driven by methylotrophic methanogens

(メチル基利用メタン生成アーキアによる新規栄養共生)

本論文は英文 128 頁，図 23，表 11，7 章からなり，参考論文 3 編が付されている。

無酸素環境下における有機物分解に伴うメタン生成は，地球規模の炭素循環並びに大気中の温室効果ガス増加に大きな影響を及ぼしている。これまで，大部分のメタンは水素・二酸化炭素（もしくはギ酸）を基質とする水素利用メタン生成アーキア，および酢酸を基質とする酢酸利用メタン生成アーキアが生産するとみなされていた。しかし近年，メタノール等のメチル基を基質とするメチル基利用メタン生成アーキアがほとんどの嫌気環境に普遍的に存在し，また地下原油貯留層など一部の環境では優占化していることが明らかとなった。しかしほとんどの環境でメチル化合物はほとんど存在せず，またメチル化合物を供給する化学的・生物的経路も知られていなかった。本研究では，地下原油貯留層から単離されたギ酸酸化細菌 *Zhaonella formicivorans* とメチル基利用メタン生成アーキア *Methermicoccus shengliensis* を使用し，1) *Zhaonella* がギ酸からメタノールを生成しそれを *Methermicoccus* がメタンに変換する共生的メタン生成が成立すること，2) *Zhaonella* が既知の 3 つの代謝経路を組み合わせた新規経路でメタノールを生成すること，3) 上記反応が熱力学的に優位であり自然環境でも進行しうること，の実証に成功したものである。

1) 共培養によるメタノール依存型共生的メタン生成の実証

Zhaonella はギ酸を唯一の炭素・エネルギー源とした条件で生育することはできなかった。しかし濃縮菌体を用いた実験により，ギ酸からメタノールを生成する能力はあるが，熱力学的制限によりその反応が停止することが示された。生成したメタノールを消費可能な *Methermicoccus* との共培養により，その制限が解除され，ギ酸からの共生的メタン生成が進行することが確かめられた。共培養液からは μM レベルの低濃度メタノールが検出され，生成したメタノールが速やかに消費されていることが示された。 ^{13}C ラベルギ酸を用いた培養試験，フィルターにより両微生物の直接接触を制限する培養実験などにより，水素や電子を媒介とした既知の共生反

応の存在は否定され、メタノールを媒介とした未知の共生的メタン生成の存在が実証された。

2) ゲノム、トランスクリプトーム解析によるメタノール生成代謝経路の同定

Zhaonella のゲノム解析，並びに純粋培養と共培養時の比較トランスクリプトーム解析により，ギ酸からメタノールに至る代謝経路の特定を試みた。*Zhaonella* は嫌気性のギ酸利用菌によくみられる formate dehydrogenase を有するが発現量は極めて低く，代わりに好気性細菌でよくみられる aldehyde ferredoxin oxidoreductase と alcohol dehydrogenase によりギ酸をメタノールにまで還元していることが考察されている．またギ酸を酸化する経路の候補として Wood-Ljungdahl pathway と glycine/serine pathway の遺伝子群が高発現していることが明らかにされた．以上の結果を踏まえ代謝経路を再構築したところ，上記経路の組み合わせにより TCA 回路に似た未知の炭素酸化回路が機能することで，ギ酸の二酸化炭素への酸化とメタノールへの還元が可能になることを明らかにした．

3) 熱力学計算に基づく新規共生代謝の評価

Zhaonella がもつ electron bifurcation 酵素（得られた高還元力をプロトン濃度勾配に変換するための機構）の情報を踏まえ，*Zhaonella* は上記の新経路により 1 モルのメタノール生産当たり 0.3~1 モルの ATP を生産可能であることが示された．また熱力学計算により共生が成立しうる中間体物質の濃度範囲を算出したところ，メタノールを中間体とした共生は既知の水素を中間体とした共生的メタン生成よりも数オーダー広い濃度範囲で反応が進行可能であることを考察している．以上の結果から今回新たに発見した共生代謝は自然環境中において既知の共生反応よりも優位に機能しうることを明らかにした．

以上，本研究では微生物の培養実験，ゲノム・トランスクリプトーム解析，熱力学計算などを駆使することにより，これまで未知であったメタノールを中間体とした共生的メタン反応の発見，嫌気微生物では例がなかったメタノールを生成する生物反応の発見，および3つの既知経路の組み合わせによる新規代謝回路の発見，という非常に高い科学的意義を持つ成果をあげた．以上の成果は，地球規模の炭素循環に大きく寄与するメタン生成反応への理解を深めることに寄与し，またクリーンエネルギー源として期待されているメタンの生成効率化技術の開発につながる可能性を秘めたものであると考察している．

よって審査員一同は，Huang Yan が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．