

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名

小貫 元治

本研究は、廃水からの生物学的リン除去に関する基礎研究として位置づけられるものであり、「PCR-DGGE 法を中心とする微生物群集解析手法を用いた生物学的リン除去を担う微生物群の検索」と題する。今日、閉鎖性水域の富栄養化の原因物質として廃水からのリン除去の必要性が叫ばれ、生物学的あるいは物理化学的なリン除去技術が研究開発されている。その中で、生物学的リン除去法は、経済性やリン回収システムへのリンクの可能性の大きさから強く期待されている技術であるが、原理機構に関する情報不足や、時として見られる処理の不安定さから、必ずしもその長所が十分に活かされていない。また、生物学的リン除去に関わる微生物の代謝の特異さは微生物学的にも注目を集め、微生物生態学の研究対象として特に近年は精力的に研究が進められてきた。それにもかかわらずリン除去を担う微生物を単離培養し同定することに誰も成功していない。そのような状況にあって、本研究は、生物学的リン除去の基礎研究の核となる「リン除去を実質的に担う微生物の検索」という中心課題に正面から取り組んだものである。しかも、この数年、分子生物学的手法を中心とする微生物群集解析技術が画期的な進歩を見せ、微生物を単離培養する事なく、遺伝子の解析から群集構造の解析ができるようになってきた。本研究ではそのような新しい群集解析手法を全面的に取り入れて上記の課題に取り組んでおり、まさに時機を得た研究であると言える。

第1章は「はじめに」であり、本研究の背景となる生物学的リン除去に関する研究の現況を概観し、本研究の意義を述べている。

第2章は「既往の研究」であり、本研究の対象とする技術である生物学的リン除

去法に関する既存の知見のまとめ、本研究で用いた微生物群集解析手法の整理、および、生物学的リン除去法に関与する微生物の群集構造に関するレビューをおこなっている。

第3章は、「本研究の目的と論文の構成」である。本研究の目的はリン除去を担う微生物の検索であることを宣言するとともに、さらに、本研究で生物学的リン除去を担う微生物を検索し分子生物学的に同定することを試みるにあたり、既存の研究と比べどのような戦略で研究を進めたかを示している。また、論文の構成を記している。

第4章は「方法」である。本研究では、実験室内で単純な組成の炭素源を用いて生物学的リン除去リアクターを運転することにより、リン除去活性が発現すると同時に微生物群集構造が単純化してゆく系を作り、そのプロセスの群集構造変化とリン除去活性を比較することで、生物学的リン除去において中心的役割を果たす細菌を見つけ出すという戦略を用いている。群集解析には、16SrRNA 遺伝子中の 200bp 程度の短い DNA 断片をターゲットとして、DGGE 法と呼ばれる DNA 断片の分離手法により群集構造の変化を追跡する方法を開発した。本章ではこのような戦略に関わる要素技術について説明している。

第5章は「酢酸を唯一の炭素源として運転した系の微生物群集解析」である。本章では炭素源として酢酸のみを用いたリン除去リアクターの微生物群集について考察した。その結果、リン除去活性の出現に呼応して細菌群集構造は単純化し、その中で明らかに優先してきたグループを見いだした。その遺伝子解析から、*Rhodocyclus* グループに相同性の高い DNA 配列を持った微生物群がポリリン酸を蓄積しリン除去を担っていることが確認できた（「*Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群」と言えるものとしている）。この微生物群に系統学的に近い細菌が、スイスおよびオーストラリアのグループからも報告されており、酢酸を基質としたときのリン除去を担う細菌は *Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群であることがほぼ確定できたことになる。なお、分子生物学的に見つけた細菌が、実際に廃水処理においてポリリン酸蓄積をおこなっているかどうかを確認するために、この *Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群を標的とした DNA プロブによる蛍光原位置染色法（FISH 法）とポリリン酸染色法を顕微鏡上で同じ微生物サンプルに適用し、両者が同一の細菌であることを証明する手法を本章で確立している。

第6章は「プロピオン酸を唯一の炭素源として運転した系の微生物群集解析」と題し、炭素源としてプロピオン酸のみを用いたリン除去リアクターの微生物群集を解析した。その結果、プロピオン酸が炭素源の系でも、酢酸と同様の *Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群がリン除去を担っていることが示され、この微生物群は酢酸のみならず、プロピオン酸をも基質としてリン除去をおこなう能力があることが示された。

第7章は「グルタミン酸を主な炭素源として運転した系の微生物群集解析」である。グルタミン酸を主要炭素源とした場合、リン除去がなかなかうまくゆかず、3回おこなった Run のうち2回は十分なリン除去活性の発現を見なかった。一方、3回目の Run ではリン除去活性の消長をきれいにとらえることができ、その群集解析から、酢酸を炭素源としたときにリン除去を担っている *Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群とは全く異なる細菌がリン除去を担っていることがわかった。この微生物は、クローニングによる 16SrRNA 遺伝子の全長配列の解読から、緑色非硫黄細菌に近縁の新規微生物と考えられた。*Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群以外の微生物がリン除去を担う優先微生物として示唆されたのは初めてである。今後、この細菌群を標的とした DNA プローブの開発、およびその実サンプルへの適用が必要だとしている。

第8章は「ペプトン・酵母エキスを主な炭素源として運転した系の微生物群集解析」である。炭素源が複雑なので、予想どおり群集構造の単純化は見られなかったが、遺伝子を解析したところ、グルタミン酸を炭素源としたときにみつかった非硫黄細菌に近縁の新規微生物と同じ細菌が見つかっており、この細菌がある種のアミノ酸系の炭素源に親和性の高いリン蓄積微生物である可能性が示唆された。

第9章は「総括」であり、本研究全体を総括し得られた結果をとりまとめると、今後おこなうべき研究やそのための戦略について提言している。

生物学的リン除去法は、すでに実用化の域に達しつつあるにもかかわらずその原理機構にまだまだ不明な点が多い技術であり、なおかつ、その特異的代謝を明らかにすることは学術的な意義もきわめて大きい。そのような生物学的リン除去法の基礎研究の大前提が、リン除去を担っている微生物を特定し、その系統学的な位置を明らかにすることである。これまでの生物学的リン除去の研究において、歴史的な経緯から酢酸を炭素源とする系の解析のみに偏って解析がなされ、微生物群集解析に関しても酢酸の系についてのみこれまでもいくつかの知見が得られていた。本論文の最大の功績は、酢酸を炭素源とした系ではこれまで示唆されていたとおりに *Rhodocyclus* 近縁ポリリン酸蓄積微生物群がリン除去を担っていることを実験的に証明したことに加え、酢酸以外の炭素源においては別の微生物がリン除去を担っていることを示した点である。しかも、この新規微生物に関する 16SrRNA 遺伝子の配列まで特定したので、今後、この新規微生物の機能についても調べる道筋を開いたといえる。今後、リン除去に関わる微生物群集に関して基礎研究を積み重ねることの重要性は非常に大きく、本研究はそのためのきわめて優れた基盤を作ってくれたといえる。以上のような観点から、本研究は都市工学とりわけ環境工学の発展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。