

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 頼 泰 樹

土壌微生物群集は土壌生態系における安定な作物生産や物質循環、環境保全などの極めて重要な役割を果たしている。そのため土壌微生物の群集構造を明らかにする試みが古くから行われてきており、特に近年は微生物の培養を経ない群集構造解析法が開発されてきた。すなわち各微生物を特徴付けるバイオマーカーを土壌から直接抽出して解析することによりその土壌に存在する微生物の群集構造を明らかにしようとするものである。

筆者は土壌中での有機物分解に関与する微生物の群集構造解析を試みてきた過程で、従来の群集構造解析法では日本の代表的な土壌の一つである火山灰土壌を対象とした場合、バイオマーカーの抽出量が極めて少ないことなど、現状ではその解析結果の信頼性に大きな問題があることを見出していた。本論文ではその問題を解決すべく、土壌微生物の群集構造解析法として土壌抽出 DNA を用いた PCR-DGGE 解析、リン脂質脂肪酸組成解析、キノン組成解析という主要な 3 種類の方法を取り上げ、それらの改良と相互比較を行った結果について述べたもので、6 章からなっている。

序論である第 1 章に引き続き、第 2 章では土壌からの DNA 抽出法の開発について述べられている。土壌から DNA を直接抽出し、PCR 反応を用いて解析対象の塩基配列を増幅し、クローニングや PCR-DGGE などを経た土壌微生物群集構造解析が現在行われている。いくつかの土壌 DNA 抽出法が海外の研究者により報告されているが、それらの方法では日本の主要な土壌の一つである火山灰土壌からは DNA 抽出効率が極めて悪く、また腐植の混入が問題となり、精製操作に時間を要した。そこで火山灰土壌からも抽出可能でかつ簡便な土壌 DNA 抽出法の開発を試みた。抽出条件を詳細に検討した結果、EDTA とリン酸緩衝液の高濃度混合溶液を用いると火山灰土壌からも十分な量の DNA 抽出が可能になった。火山灰土壌からの DNA 抽出においては、火山灰土壌の DNA 吸着部位すなわちアロフェンに含まれる活性 Al をキレートあるいはマスクングすることが不可欠であるため、EDTA およびリン酸緩衝液を極めて高濃度で使う必要があったと考えられる。また DNA とともに土壌から抽出される腐植物質は極微量でも PCR 反応を阻害するため、DNA 抽出後に腐植の除去を目的とした精製操作が必要である。そこで腐植物質の混入を低減する抽出条件を明らかにするとともに、CTAB 処理と PEG 沈殿という原理の異なる簡便な精製を組み合わせることにより、PCR 可能な高純度 DNA を得ることができる精製方法を開発した。今回開発した抽出、精製方法は非常に簡便であり、しかも PCR 可能な DNA を極めて多量にかつ再現性よく土壌から得られる方法である。

第 3 章では PCR-DGGE 解析において問題となる heteroduplex (相補鎖同士が正しくない組み合わせの二本鎖 DNA) の解消法を検討した結果について述べられている。塩基配列が既知の細菌株について 16S rRNA 遺伝子の V3 領域を増幅し DGGE 解析したところ、複

数のリボタイプを持つ菌株の中には heteroduplex に由来する泳動パターンを示すものが存在し、この heteroduplex のバンドが群集構造解析の際にも出現する可能性があった。そこで heteroduplex が生成する条件ならびにその解消方法について、既知の細菌株を用いて検討した。その結果 PCR の反応サイクル数が多い場合に heteroduplex 生成率が高くなること、PCR 産物の最大収量 (plateau phase) の約 1/3 量が得られた時点で反応のサイクルを止めることで、DGGE 解析のバンドパターンに影響を与えない程度に heteroduplex の生成をとどめることが可能であることを明らかにした。

第4章では、土壌リン脂質およびキノンの分析法の改良について述べられている。土壌からリン脂質およびキノンを抽出する際、従来、リン脂質は Bligh & Dyer 法、キノンは Folch 法と異なる 2 つの方法で抽出していた。しかしリン脂質もキノンも脂質分子であるので、Bligh & Dyer 法で両者を全脂質として抽出し、それぞれの画分に分画する方法を検討した。また、リン脂質は親水基であるリン酸基を持つことから、DNA と同様にアロフェンに吸着され抽出量が少なくなっている可能性を考えた。そこで抽出の際、高濃度 EDTA-リン酸緩衝液を用いる抽出方法も検討した。その結果、リン脂質およびキノンを同時に抽出し、その後分画する新方法を確立した。さらにこの新方法では従来法と比較してキノンの抽出量はほとんど変化しないものの、火山灰土壌からのリン脂質の抽出においては最大約 2 倍の収量が得られた。

第5章ではバイオマーカーとバイオマスとの相関について述べられている。新方法により土壌 DNA やリン脂質の抽出効率が改善されたことから、得られた土壌 DNA やリン脂質、キノン量が土壌バイオマス量と相関が得られるか、またこれらのバイオマーカー量により土壌のバイオマス量を推定することが可能であるかを検討した。

第6章では研究の総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、様々な土壌から大量の DNA を抽出する手法を開発し、加えて PCR に伴う問題を解決することにより、土壌微生物の群集構造解析の信頼性向上を実現した。さらに主要なバイオマーカーの抽出効率の改善により、土壌微生物の群集構造解析をより定量的なものへと前進させたものであり、学術上応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。