

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 後藤 慶一

本論文は、近年急速な進歩を遂げている分子系統分類学的手法に着目し、幅広い好気性芽胞形成細菌に対応可能な同定法を開発したもので、全6章から構成される。

第1章では16S rRNA 遺伝子の多様性領域に基づく *Bacillus* 属細菌の迅速同定法の開発について述べた。*Bacillus* 属細菌68種の基準株の16S rDNA 塩基配列を決定し、多重配列解析を行った。その結果、16S rDNA 塩基配列は非常に種特異的で、この配列の比較によって *Bacillus* 属細菌を種レベルで同定あるいはグループ化することが可能であることを示した。さらに、多重配列比較の結果から、16S rDNA の5'末端側に約300塩基の変異に富む領域（Hyper Variable 領域：HV 領域）を見いだした。このHV 領域が種レベルの同定の指標となりうるか否かを、基準株と参照株についてHV 領域のプライマーセットを用いて検証した。その結果、HV 領域は種内で非常に良く保存され、かつ種間で異なっており、HV 領域の塩基配列の相同性解析により、簡便に *Bacillus* 属細菌を同定あるいはグループ化することが可能であることを示した。

第2章では *Alicyclobacillus* 属細菌の分類と同定法の開発について述べた。清涼飲料業界で非常に問題視されている *Alicyclobacillus* 属細菌6種および1遺伝種の24菌株について16S rDNA およびHV 領域の解析を行ったところ、*Bacillus* 属細菌と同様に、HV 領域は *Alicyclobacillus* 属細菌を種レベルで同定、あるいはグループ化するための指標として非常に優れていることを示した。同時に、清涼飲料原料および製品から分離された新規 *Alicyclobacillus* 属細菌に関して、多相分類学的検討を行い、それぞれ *A. acidiphilus*、*A. herbarius* および *A. pomorum* を提案するとともに、*Alicyclobacillus* 属の記載に修正を加えた。また、日本の様々な環境から分離された60菌株の高温性・好酸性芽胞形成細菌にHV 領域の解析法を応用したところ、58菌株については *A. acidocaldarius* あるいは *Alicyclobacillus* genomic species 1 と同定され、またいずれにも当てはまらない2菌株については、新規遺伝種 *Alicyclobacillus* genomic species 2 として提案した。さらに、業界で問題視されている異臭（グアイアコール）産生菌種について検討を加え、*A. acidiphilus*、*A. acidoterrestris*、*A. herbarius* および *A. hesperidum* に近縁な *Alicyclobacillus* sp. がグアイアコー

ルの産生菌種であることを明らかにした。

第3章では16S rRNA 遺伝子の多様性領域に基づく *Paenibacillus* 属細菌の迅速同定法の開発について述べている。*Paenibacillus* 属細菌 28 種 56 菌株について、HV 領域の解析を行ったところ、HV 領域は種レベルで高度に保存されていることが確かめられた。

第4章では *Brevibacillus* 属および *Aneurinibacillus* 属細菌の分類と同定法の開発について述べた。29 菌株の *Brevibacillus brevis* について HV 領域を解析したところ、そのほとんどは *B. brevis* 以外の種と高い相同性を示した。分類学的な試験の結果、これらは誤同定であることが明らかとなり、*Aneurinibacillus* 属および *Brevibacillus* 属の適切な種へ再同定した。また、*B. brevis* として同定されていた菌株中に、いずれの既知種にも当てはまらない 2 菌株が見いだされ、これらを分類学的な試験結果に基づき、それぞれ *Aneurinibacillus danicus* および *Brevibacillus limnophilus* と命名した。総計 50 菌株についての HV 領域の解析結果は、HV 領域が種レベルで高度に保存されており、同定あるいはグループ化に有効であることを示した。また、*B. brevis*、*B. formosus* および *B. choshinensis* は互いに非常に近縁で、関連菌株を含めた再分類が必要であることが示唆された。

第5章ではその他の好気性芽胞形成細菌への 16S rRNA 遺伝子の多様性領域に基づく *Bacillus* 属細菌の迅速同定法の応用について述べた。前述した属以外の好気性芽胞形成細菌 11 属 (*Geobacillus*, *Virgibacillus*, *Amphibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Thermoactinomyces* 属など) 52 種について 16S rDNA および HV 領域の解析を行った。その結果、基本的に HV 領域はそれぞれの基準株に特異的で、近縁種の基準株との区別が可能であることを示した。

第6章は総括で、好気性芽胞形成細菌全体を通じて、生理・生化学的性状では区別ができない菌種も、HV 領域の塩基配列を比較することにより、容易に好気性芽胞形成細菌を同定、あるいはグループ化することが可能であることを明らかにした。

以上本論文は、好気性芽胞形成細菌の迅速な同定法の開発について検討したもので、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。