審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名　　岩井　祥子

本研究は、「オリゴヌクレオチドマイクロアレイによるベンゼン酸化分解遺伝子の網羅的解析と土壌浄化力評価手法としての有効性」と題して、７つの章から論文を構成している。

第１章では、研究の背景と目的、および論文の構成を述べている。

第２章では、遺伝子配列の情報化と環境サンプル中の分解機能遺伝子の検出例について述べた後、マイクロアレイ法の概要やベンゼン分解遺伝子およびその配列情報について詳細に整理している。

第３章では、データベースに登録されているベンゼン遺伝子配列をもとに，環境中のベンゼン分解遺伝子を幅広く捉えるプライマーの設計を試みた結果が示されている。ベンゼンモノオキシゲナーゼについては、既報の 2 種類の遺伝子配列およびその近縁配列に対し、それぞれプライマーセット（BO11、BO12）を設計している。また、4 種類の分解遺伝子配列が報告されているベンゼンジオキシゲナーゼについては、同一のフォワードプライマーを用いる 2 種類のプライマーセット（BEDe、BEDm）を提案している。さらに、Baldwin らの設計したモノオキシゲナーゼを対象とする RDEG プライマーセットを含めた 5 種類のプライマーセットにより，ベンゼン分解遺伝子を幅広く捉えることが可能であることを示している。

第４章では、蓮田土壌と畑地土壌を用いたベンゼン分解試験を行い、上記の 5 種類のプライマーセットを用いて、土壌中のベンゼンオキシゲナーゼ配列の多様性解析を行っている。その結果、BO11、BO12、RDEG、BED（BEDe および BEDm）それぞれのプライマーセットに対し、27、22、48、46 種類の多様なアミノ酸配列を得ている。そして、2 種類の土壌から得られた配列には同一のものはなく、また既報のベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子と近縁な配列だけでなく新規のクラスターを形成する配列も得られ、土壌中のベンゼンオキシゲナーゼの多様性が高いことを明らかにしている。また、ベンゼン分解の進行に伴い相対的に割合が増加した配列を見いだし、ベンゼン分解への関与を示唆する知見を得ている。

第５章では、ベンゼン分解試験におけるベンゼンオキシゲナーゼの多様性解析の結果をもとに、60mer のオリゴヌクレオチドマイクロアレイの作製を行っている。まず、特異的なプローブ設計のために、ターゲットに対し相同塩基数が 58/60bp 以上、ノンターゲットに対する相同塩基数が 54/60bp 以下かつストレッチ長が 20bp 以下という条件を設定して､99 種類のプローブによるアレイ A を作製している。このアレイ A を用いて、プローブのターゲットとする配列を有する純菌株の DNA を用いたハイブリダイゼーション試験の結果、SNR（シグナルノイズ比）≧3 を陽性とする一般的な判定法では、サンプル中に含まれる配列をターゲットとするプローブは全て陽性を示し、偽陰性は観察されなかったことを報告している。しかし、偽陽性を示したプローブが約 2.7%と僅かながら観察された。偽陽性を示したものは１つの例外を除き SNR が低く 20 以下であったことから、3<SNR≦20 の範囲のシグナル強度を陽性の中でも亜陽性と定義し、判定の信頼性を表すことを提案している。

次に、アレイ A の結果を踏まえ、ターゲットに対し相同塩基数が 57/60bp 以上、ノンターゲット

に対する相同塩基数が 56/60bp 以下、ストレッチが 25bp 以下の条件において全ての配列を網羅するプローブ設計を試みている。その結果、モノオキシゲナーゼ配列に対し、新たに 12 種類のプローブを設計し、ジオキシゲナーゼ配列の解析結果に対し、53 種類のプローブをさらに設計した。解析を行ったベンゼンオキシゲナーゼ全ての配列を網羅するようにアレイ B を作製している。

第６章では、マイクロアレイ B を用いて、様々なベンゼン分解土壌および石油汚染土壌中のベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子の網羅的検出を行った結果、複数の土壌において陽性を示すプローブが観察され、かつそのプローブの標的配列はベンゼン分解実験において培養とともに相対的にその割合が増加した配列であったことから、ベンゼン分解に関与している可能性を示している。今後、リアルタイム PCR 法などを用いて定量を行い、さらに分解との関連を調べていくことで、ベンゼン分解評価のための指標としての利用可能性を指摘している。

また，マイクロアレイによる検出パターンを元にしたクラスター解析を行い，土壌サンプルをベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子構成により分類できることを示している。今後，さらに様々な土壌中のベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子の情報集積を行うとともに、データベースに蓄積される配列情報を解析しながらアレイを改良する必要があるとしている。このようなマイクロアレイの改良を通じて、ベンゼン分解に関与する遺伝子をより詳細に推定を行うことや、浄化力と関連付けて様々なベンゼン分解特性を持つ土壌の検出パターンを蓄積することにより，土壌の浄化力を評価できる手法に発展すると結論付けている。

第７章では、上記の研究成果から導かれる結論と今後の課題や展望が述べられている。

以上の成果では、ベンゼンの好気分解における初発酸化酵素遺伝子（オキシゲナーゼ）を対象として，土壌サンプル中におけるその配列の多様性を詳細に解析し，その結果をもとにオリゴヌクレオチドマイクロアレイを作製している。作製したマイクロアレイは非常に感度よく土壌試料中のベンゼンオキシゲナーゼ配列を捉えることができ、このマイクロアレイを用いることで特定の配列の有無の評価，土壌中の分解遺伝子全体像の評価の双方が可能であると考えられる。これらの知見は、遺伝情報の網羅的解析による汚染土壌の浄化力の評価手法の開発に役立つだけでなく、土壌環境中の遺伝子の多様性を解析するにも非常に有用なデータや知見を提供しており、都市環境工学の学術の進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。