

審査の結果の要旨

氏名 飛野 智宏

本論文は、「複合微生物系に対する基質特異的な微生物探索手法としてのショットガンアイソトープアレイ法の開発」と題したもので、微生物生態系の場において特定の機能をもつ微生物を検出するための手法を開発したものである。環境工学においては、生物学的廃水処理法や、バイオレメディエーション技術による地下水・土壌汚染浄化など、微生物群集の機能を利用した環境浄化・対策技術がある。従来より、処理対象物の分解可能性の判断、さらには処理性能の予測やその効率化を行うために、群集中のどの微生物が対象とする物質の分解に関与しているかを明らかにする試みがなされてきている。近年、Stable isotope probing (SIP) 法や Microautoradiography-Fluorescence in situ Hybridization (MAR-FISH) 法、Isotope array 法など、同位体元素をトレーサーとして用いる分子生物学的手法の開発により、対象物質を資化する微生物の解析が可能になってきた。しかしながら、SIP 法は遠心分離による標識核酸の分離が不明瞭であり、MAR-FISH 法、Isotope array 法は塩基配列情報の入手可能な微生物しか検出できない。

本研究では、前もって塩基配列情報を必要としない検出手法として、ランダムに断片化された微生物ゲノム断片を用いたアレイ（ショットガンアレイ）によるアイソトープアレイ法の開発を行っている。本論文は、この新規な微生物生態系解析手法について、実験的に検討を行い、手法としての有用性を示したものである。本論文は以下の 8 章より構成される。

第 1 章では研究の背景と目的、および論文構成を記している。

第 2 章では、同位体トレーサーを用いた分子生物学的手法と、DNA アレイ法について既往の研究をまとめている。

第 3 章では、本論文中で用いた実験方法についてまとめている。

第 4 章では、ショットガンアレイ法の特異性についての検討を行っている。検討には全ゲノム配列既知の *Pseudomonas* 属の純粋培養菌株 4 株を用いている。その結果、同属異種の菌株においては、高度に保存されている *rrn* オペロン配列では特異的な検出は不可能であるものの、そのほかの配列では条件を厳しく

することにより、特異的なシグナルを非特異的なものと比べ 10 倍以上の強度で得ることができることを明らかにしている。これより、ロングオリゴヌクレオチドプローブによるマイクロアレイと同程度の特異性が達成可能であると示している。

第 5 章では、放射線検出系で得られる検出感度の向上と、必要となるトレーサー量の検討を行っている。用いた放射線検出装置の検出下限 (2dpm/spot) に対し、2000bp の DNA 断片プローブとのハイブリダイゼーションにより、基質の資化に 10% 寄与した微生物を検出するために必要となるターゲット ^{14}C 標識ゲノム DNA は 400,000dpm/ml であると見積もっている。

第 6 章では、実際の解析対象として廃水処理装置の活性汚泥を用い、手法の有効性を示している。硝酸還元条件で酢酸およびメタノールを活性汚泥に投与することにより、96 個のプローブからなるショットガンアレイのうち酢酸投与で 20 個、メタノール投与で 19 個のプローブが陽性と検出され、うち 11 個は両方の基質で陽性であった。陽性となったプローブの塩基配列は、データベースとの配列相同性が最大でも 85% であり、現状では微生物種の特定には遺伝子データベースが不十分であることが明らかとなった。さらにショットガンアイソトープアレイによる検出結果を、安定同位体プローブ法により検証している。5 個の陽性プローブと 4 個の陰性プローブについて特異的な PCR プライマーを設計し、同位体を取り込んだ DNA 画分を調べたところ、1 つを除き検出結果が正しいことを検証している。この結果より、ショットガンアイソトープアレイ法が実際の微生物生態系において、基質を資化した微生物を特異的に検出できる手法であることを示している。

第 7 章では、ショットガンアレイにおけるプローブの特異性を判別する方法として、2-ray hybridization 法を提案し、その有効性を理論的かつ実験的に検討している。その結果、非特異的なシグナルの大部分が判別可能であることが純粋菌株を用いて示されている。さらに、第 6 章の結果を検証し、放射線シグナル強度と 2-ray hybridization の結果を併せて考慮することで、信頼性の低いシグナルを判別することに成功している。

第 8 章では、本研究のまとめを示すとともに、本手法の特徴を生かした適用方法について示し、さらに今後の課題についてまとめている。

微生物群集解析の技術が進化するにつれ、微生物生態学からの群集解析のアプローチは、メタゲノム解析をベースとする網羅的解析技術へと進展しており、環境工学において有用な機能を解析したいという、いわば目的からのアプローチとの乖離が進んでいる。本研究では、このような流れとは一線を画し、機能と系統を結びつけようとするより直接的な方法を提案し、かつ手法の有用性を検証しているものであり、きわめて新規性が高く、技術開発としての完成度も

高いものである。さらに本研究成果は微生物生態学との境界領域における学際的な研究であって、微生物生態学においても大きな意義をもつものである。以上のような観点から、本研究は都市環境工学の学術の発展に非常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。