

博士論文概要

論文題目

Application of terminal restriction fragment length polymorphism
to environmental biotechnology

T-RFLP 法の環境バイオテクノロジーへの応用

申請者

Takeshi	Terahara
寺原	猛

応用化学専攻 化学工学研究

2007年 12月

従来の微生物学研究は環境中から採取した微生物の分離・培養を基盤に行われてきたが、近年、急速に発展してきた分子生物学的手法により、培養を伴わずに複合微生物生態系の解析が可能になってきた。分子生物学的手法によって環境微生物の分類学的な同定が行われた結果、微生物は複雑に相互作用しており、環境中での一連の物質代謝が複数の菌株の共代謝によって行われているケースが多いことなどが明らかになってきた。さらに、現在の技術で培養可能な微生物は実際に環境中に存在する微生物の1%程度に過ぎないことも明らかになってきた。このような複合微生物生態系は多岐にわたって活用される可能性を秘めており、特に2つの観点で着目できる。一つは、生物機能として活用する場合であり、その機能を活かすためには複合微生物叢の理解が必要不可欠である。特に、反応を担う微生物群の挙動を把握すること、すなわちモニタリングすることが極めて重要である。もう一つは、培養可能な微生物は僅かであるため、生物資源として活用する場合である。最近、環境中から取得したDNAの解析、いわゆるメタゲノム解析が注目されているが、メタゲノム解析を網羅的に行うことはコストや時間を要するため、効率的なスクリーニング系を構築する必要がある。よって、両観点において複合微生物叢を簡易に把握、すなわちプロファイルし、モニタリングもしくはスクリーニングに適用できる手法が求められている。

本論文では、微生物叢プロファイリング手法として Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法に着目した。T-RFLP法は蛍光標識したプライマーを用いて増幅したPCR産物を制限酵素で断片化し、その断片を電気泳動によって分離する手法であり、簡便かつ迅速に微生物種とその存在比を解析できるために微生物叢のプロファイリングに有効である。そこで、本手法を用いて複合微生物叢を簡易に把握し、モニタリングやスクリーニングに適用し、その有効性を検討した。具体的には、生物機能の観点からは生物学的排水処理に着目し、硝化工程、脱窒工程、および長期間連続運転時の排水処理微生物叢をそれぞれT-RFLP法によって解析し、その変遷をモニタリングした。また、排水処理能と微生物叢との関係および外部環境因子の変動に対する微生物叢の変遷を解析することにより、複合微生物叢のモニタリングにT-RFLP法を適用することの有効性を示した。一方、生物資源の観点からは環境試料を未利用遺伝子資源と位置づけ、T-RFLP法によって遺伝子の多様性を解析し、環境試料からの遺伝子スクリーニングへの適用について検討した。具体的には、T-RFLP法とクローニング法を用いて土壌中のキチナーゼ遺伝子の多様性を解析・比較し、T-RFLP法によって遺伝子の多様性を概ね把握できることを示した。また、T-RFLP法によるリパーゼ遺伝子の多様性と環境試料から取得した新規リパーゼ遺伝子の多様性に基つき、環境試料をそれぞれグループ分けした結果に対応関係があることを見出し、環境試料からの遺伝子スクリーニングにT-RFLP法を適用することの有効性を示した。

本論文は7章で構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第1章では、分子生物学的手法の特徴やそれらを活用した微生物生態解析の現状について、既往の研究動向を整理して本論文の研究背景をまとめるとともに、意義および目的を述べた。

第2～4章では複合微生物叢のモニタリングへのT-RFLP法の適用を検討した。第2章では、生物学的排水処理能と微生物叢との関係について調べるために、排水処理槽内の微生物叢をT-RFLP法にてモニタリングすることが有効であることを示した。間欠曝気方式の排水処理槽を運転し、16S rDNAおよびrRNA遺伝子に基づいてT-RFLP法によって微生物叢の変遷をモニタリングした結果、硝化反応の開始時に特定のTerminal Restriction Fragments(T-RFs)が変化し、微生物叢が大きく変遷することがわかった。データベースを基に微生物種を同定したところ、大きく変化したT-RFsはアンモニア酸化細菌由来であることが推察され、硝化反応に関わるアンモニア酸化細菌が微生物叢内で優占していたことを明らかにした。また、アンモニア酸化細菌の16S rRNAは16S rDNAに先んじて微生物叢内での割合が増加していたことが確認され、多次元尺度法にて解析した結果、微生物叢全体で16S rRNAは16S rDNAより環境変動に鋭敏に応答することが示された。以上の結果から、T-RFLP法と多次元尺度法を組み合わせ、視覚化する方法が有効であることを示した。

第3章では、生物学的排水処理における脱窒工程に着目し、T-RFLP法によって排水処理槽内の微生物叢の変遷をモニタリングした。間欠曝気方式の排水処理槽を運転し、微生物叢を16S rRNA遺伝子に基づいてT-RFLP法およびクローニング法によって解析した。その結果、脱窒反応の開始時に増加したT-RFsはクローニング法により*Hydrogenophaga*と*Acidovorax*属細菌であることが示され、それらが微生物叢内で優占していたことを明らかにした。両細菌は既往の研究で脱窒細菌であると報告されていることから、本実験結果の妥当性が示された。また、主なT-RFsに相当する微生物の優占度をT-RFLP法とクローニング法からそれぞれ算出した。その結果、微生物の優占度は両手法でほぼ一致し、T-RFLP法がクローニング法と同程度に微生物叢を把握できる上、モニタリングに適していることが示された。

第4章では、第2、3章で示された成果に基づき、循環型水洗トイレの開発に向け、長期間にわたって循環型水洗トイレの活性汚泥の微生物叢をT-RFLP法によってモニタリングした。運転期間は200日で、1～2週間に一度サンプリングを行い、計21サンプルをT-RFLP法によって解析した。まず、100日間はアンモニアおよび硝酸態窒素が蓄積し硝化・脱窒反応は進行していなかったが、100日目に曝気条件を変更した後は速やかに硝化・脱窒反応が進行することを確認した。そして、3日目と127日目の活性汚泥サンプルを用い、クローニング法によって約100個のクローンをそれぞれ解析した。その結果、3日目の微生物叢は*Proteobacteria*と*Bacteroidetes*が各々27%と45%を占めていたが、127日目の微生物叢では

*Proteobacteria*は43%に増加した一方で*Bacteroidetes*は26%に減少したことがわかった。つぎにT-RFLP法によって詳細なモニタリングを行った結果、硝化・脱窒反応の進行に伴い*Proteobacteria*の*Nitrosomonas*属が1%から6%に、*Xanthomonas*属が3%から10%にそれぞれ増加しており、クローニング法のデータで*Proteobacteria*の割合が増加していたことが裏付けられた。*Nitrosomonas*属は代表的な硝化細菌、*Xanthomonas*属は脱窒細菌として報告されており、これらの微生物が循環型水洗トイレの主要な役割を担っていることが示唆された。さらに、循環型水洗トイレの性能と微生物叢との関連について調べるために、多次元尺度法によってT-RFLP法の結果を視覚化した。その結果、硝化・脱窒反応が進行していなかった100日後までの微生物叢は激しく変遷していたが、硝化・脱窒反応進行後は比較的安定していたことが示された。

第5、6章では環境試料からの遺伝子スクリーニングへのT-RFLP法の適用を検討した。第5章では、15種類の土壌試料中のキチナーゼ遺伝子の多様性について、T-RFLP法とクローニング法による解析結果を比較・検討した。まず、T-RFLP法のデータを多次元尺度法によって解析した結果、15種類の土壌試料は3つのグループに分けられた。一方、クローニング法では各土壌試料から30~40個ほどのクローンを取得し、合計501個を解析して、系統樹を作成した。さらに、ソフトウェアUniFracによって統計解析した結果、土壌粒子の性状やpHによって、15種類の土壌試料は5つのグループに分けられた。T-RFLP法に比べ、クローニング法ではより詳細なグループに分けられたが、大局的には概ね一致しており、複数の環境試料中の遺伝子の多様性をT-RFLP法と多次元尺度法による解析によって簡易に把握可能であることが示された。

第6章では、第5章で示された成果に基づき、環境試料から新規遺伝子を効率的に取得するため、環境試料のスクリーニングへのT-RFLP法の適用を検討した。活性汚泥、土壌、堆肥などの環境試料中におけるリパーゼ遺伝子の多様性は、T-RFLP法のデータを多次元尺度法にて解析した結果、3つのグループに分けられた。また、各種環境試料から取得した新規リパーゼ遺伝子の塩基配列の多様性も同様に3つのグループに分けられ、対応関係があることを見出した。よって、T-RFLP法を環境試料からの遺伝子スクリーニングに適用することは有効であり、環境試料から効率よく新規な有用遺伝子を取得するための基盤技術になり得ることが示唆された。

第7章では、本論文の統括および展望を記述した。

以上、本論文では、T-RFLP法を用いて複合微生物叢を簡易に把握することがモニタリングやスクリーニングへの適用に有効であることを示した。これらの研究成果は生物学的排水処理プロセスの向上のみならず環境浄化技術およびメタゲノム解析の効率化などの環境微生物を利用したバイオテクノロジーの発展に大いに寄与することが期待される。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 寺原 猛 印

(2007年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>(1) (報文) Kazutaka Yamada, <u>Takeshi Terahara</u>, Shinya Kurata, Toyokazu Yokomaku, Satoshi Tsuneda, and Shigeaki Harayama, Retrieval of Entire Genes from Environmental DNA by Inverse PCR with Pre-Amplification of Target Genes Using Primers Containing Locked Nucleic Acids, <i>Environ Microbiol</i>, (in press).</p> <p>○ (2) (報文) Tatsuhiko Hoshino, <u>Takeshi Terahara</u>, Kenji Yamada, Hideo Okuda, Isao Suzuki, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Yuhei Inamori, Long-Term Monitoring of the Succession of a Microbial Community of Activated Sludge in a Circulation Flush Toilet as a Closed System, <i>FEMS Microbiol. Ecol.</i>, 55(3), 459-470 (2006).</p> <p>○ (3) (報文) Tatsuhiko Hoshino, <u>Takeshi Terahara</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Yuhei Inamori, Molecular Analysis of Microbial Population Transition Associated with the Start of Denitrification in a Wastewater Treatment Process, <i>J. Appl. Microbiol.</i>, 99(5), 1165-1175 (2005).</p> <p>○ (4) (報文) <u>Takeshi Terahara</u>, Tatsuhiko Hoshino, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Yuhei Inamori, Monitoring the Microbial Population Dynamics at a Start-up Stage of Wastewater Treatment Reactor by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Based on 16S rDNA and rRNA Gene Sequences, <i>J. Biosci. Bioeng.</i>, 98(6), 425-428 (2004).</p> <p>○ (5) (報文) 星野辰彦, <u>寺原猛</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, T-RFLP法による排水処理細菌叢の迅速モニタリング, 用水と廃水, 46巻5号, 56-60, (2004).</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>国際学会</p> <p>(1) <u>Takeshi Terahara</u>, Kazutaka Yamada, Shinya Kurata, Toyokazu Yokomaku, Satoshi Tsuneda, Shigeaki Harayama, Pre-amplification Technique of Flanking Region for Isolating Entire Gene from Environmental DNA by Inverse PCR, The 107th General Meeting on American Society for Microbiology, Toronto, 21-25, May, 2007</p> <p>(2) <u>Takeshi Terahara</u>, Kazutaka Yamada, Shinya Kurata, Toyokazu Yokomaku, Satoshi Tsuneda, Shigeaki Harayama, Isolation of Novel Lipase Genes from Environmental DNA Using Pre-amplified Inverse PCR, The 11th International Symposium on Microbial Ecology, Vienna, 20-25, August, 2006</p> <p>(3) Kazutaka Yamada, <u>Takeshi Terahara</u>, Shinya Kurata, Toyokazu Yokomaku, Satoshi Tsuneda, Shigeaki Harayama, Improving the Sensitivity of the Inverse PCR for Direct Cloning of Specific Genes from Environmental Samples, The 11th International Symposium on Microbial Ecology, Vienna, 20-25, August, 2006</p> <p>(4) <u>Takeshi Terahara</u>, Tatsuhiko Hoshino, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Yuhei Inamori, Monitoring the Microbial Population Dynamics at the Start-up Stage of Wastewater Treatment Reactor using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, The 8th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, Lyon, 26-29, June, 2005</p> <p>(5) Tatsuhiko Hoshino, <u>Takeshi Terahara</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Yuhei Inamori, Monitoring Complex Bacterial Communities Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: Application to Wastewater Treatment Reactor, The 10th International Symposium on Microbial Ecology, Cancun, 22-27, August, 2004</p> <p>国内学会</p> <p>(1) <u>寺原猛</u>, 山田一隆, 蔵田信也, 横幕豊一, 原山重明, 常田聡, Sequence-based approachによる環境試料からの新規遺伝子の探索, 第59回日本生物工学会大会, 広島, 2007年9月</p> <p>(2) <u>寺原猛</u>, 山田一隆, 蔵田信也, 横幕豊一, 原山重明, 常田聡, 環境試料からの未知有用遺伝子の迅速取得手法の開発, 第 58 回日本生物工学会大会, 大阪, 2006 年 9 月</p> <p>(3) <u>寺原猛</u>, 山田一隆, 蔵田信也, 横幕豊一, 原山重明, 常田聡, 未知遺伝子の迅速取得手法の開発-メタゲノム解析(Sequence-based approach)への展開-, 第9回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 2006年9月</p> <p>(4) <u>寺原猛</u>, 山田一隆, 蔵田信也, 横幕豊一, 原山重明, 常田聡, 難培養微生物の有用遺伝子取得技術の開発, 第 8 回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, 千葉, 2006 年 3 月</p> <p>(5) <u>寺原猛</u>, 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, T-RFLP法による排水処理微生物叢の簡易・迅速モニタリング, 化学工学会第69年会, 大阪, 2004年4月</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他 （特許申請）	(6) 星野辰彦, <u>寺原猛</u> , 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, T-RFLP法による生物学的排水処理反応槽内のバイオコミュニティ変遷モニタリング, 第38回日本水環境学会年会, 札幌, 2004年3月
	(7) 星野辰彦, <u>寺原猛</u> , 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, T-RFLP法による排水処理細菌槽の迅速モニタリング, 日本水処理生物学会第40回大会, 熊本, 2003年11月
	(8) 稲森悠平, <u>寺原猛</u> , 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, T-RFLP法による排水処理微生物叢の簡易・迅速モニタリング技術の開発, 第37回日本水環境学会年会, 熊本, 2003年3月
	(9) 稲森悠平, <u>寺原猛</u> , 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, T-RFLP法による排水処理微生物叢の解析評価, 日本水処理生物学会第39回大会, 埼玉, 2002年11月
	特願 2006-049825, <u>寺原猛</u> , 常田聡, 山田一隆, 蔵田信也, 原山重明, インバースPCR方法に用いる鋳型DNA鎖の生産方法, 2006年2月