

# 博士論文審査報告書

## 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

2008 年 2 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、分子生物学的手法によって培養を伴わずに複合微生物生態系の解析ができるようになった。その結果、微生物は複雑に相互作用し、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こと、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などが明らかになってきている。このような複合微生物生態系は様々な分野で活用される可能性を秘めている。特に生物学的排水処理などの生物機能、もしくは新規遺伝子や新規微生物資源などの生物資源として着目されている。生物機能として活用するためには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重要である。また、生物資源として活用するためには効率的なスクリーニング系の構築が必要である。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リングし、モニタリングや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、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ている。T-RFLP 法は蛍光標識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ことで簡便かつ迅速に微生物種とその存在比を解析できる手法である。モニタリングに関しては、生物学的排水処理プロセスの硝化・脱窒工程および長期間連続運転時における排水処理能と微生物叢の変遷との関連を明らかにし、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ている。スクリーニングに関しては、T-RFLP 法を用いて環境試料中の遺伝子の多様性を解析し、クローニング法による解析や環境試料から取得した新規遺伝子の多様性と各々比較することによって、新規遺伝子取得を目的とした環境試料のスクリーニングに T-RFLP 法を適用することの有効性を示している。

本論文は 7 章で構成されている。以下に各章の審査概要を述べる。

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、意義および目的を明確にしている。

第 2～4 章では複合微生物叢のモニタリングへの T-RFLP 法の適用を検討している。第 2 章では、硝化工程に着目し、間欠曝気方式の排水処理槽を運転し、処理水の水質および 16S rDNA, rRNA 遺伝子に基づく T-RFLP 法によって微生物叢の経時変化を解析している。その結果、硝化反応の開始時に特定の **Terminal Restriction Fragments(T-RFs)**が増加し、微生物叢が大きく変遷することを見いだしている。データベースと照合した結果、アンモニア酸化細菌由来の T-RFs であることが示唆され、硝化反応の開始時に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化することを明らかにしている。

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することを見だし、さらに多次元尺度法にて解析した結果、微生物叢全体でも 16S rRNA は 16S rDNA より環境変動に鋭敏に応答することを示している。本研究成果は、T-RFLP 法を用いて微生物叢の経時変化を解析すること、さらに多次元尺度法を組み合わせることで視覚化することが排水処理槽内の複合微生物叢のモニタリングに有効であることを示しており、排水処理分野のみならず、環境微生物学の分野からも高く評価できる。

第 3 章では、脱窒工程に着目し、処理水の水質および 16S rRNA 遺伝子に基づいた T-RFLP 法とクローニング法によって微生物叢の経時変化を解析している。その結果、脱窒反応の開始時に増加した T-RFs は *Hydrogenophaga* と *Acidovorax* 属細菌であり、それらが微生物叢内で優占化していることを明らかにしている。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も示されている。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結果、両手法でほぼ一致した値が得られることを明らかにしている。以上の成果は、T-RFLP 法とクローニング法を組み合わせた手法が複合微生物叢のモニタリングに有効であることを示し、環境微生物叢のモニタリングに広く適用し得ることを示唆している。

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処理水の水質と活性汚泥内の微生物叢の経時変化を解析している。運転期間は 200 日で、1~2 週間ごとに活性汚泥をサンプリングし、T-RFLP 法を用いて解析している。さらに 3 日目と 127 日目のサンプルをクローニング法で約 100 個ずつ解析している。まず、処理水の水質変化より、100 日目に曝気条件を変更した後に硝化・脱窒反応が速やかに進行することを確認している。クローニング解析より、3 日目の微生物叢は *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* が各々 27% と 45% を占めているが、127 日目の微生物叢では *Proteobacteria* は 43% に増加する一方で *Bacteroidetes* は 26% に減少することを示している。また、T-RFLP 法による解析から、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% に増加することを見だししている。これらの結果は、クローニング法と T-RFLP 法の両解析結果が *Proteobacteria* の割合の増加を支持することを示している。なお *Nitrosomonas* 属は硝化細菌、*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は妥当な結果であるといえる。また、T-RFLP 法のデータを多次元尺度法によって解析した結果、硝化・脱窒反応が進行していなかった 100 日ごろまでの微生物叢は激しく変遷しているが、硝化・脱窒反応進行後の微生物叢は比較的安定していることも見だししている。T-RFLP 法を基盤として、クローニング法と多次元尺度法を組み合

わせた微生物叢モニタリング手法を確立し、さらに長期間にわたってモニタリングに適用した本研究成果は、水処理技術のみならず土壌浄化技術などの環境バイオテクノロジー分野に対しても波及効果は大きく、高く評価できる。

第5、6章では遺伝子多様性に着目し、環境試料のスクリーニングへT-RFLP法を適用することの有効性を検討している。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法と多次元尺度法による解析とクローニング法による解析結果を比較している。T-RFLP法を用いた解析からは土壌試料を3つのグループに分類できることを示している。一方、クローニング法からは土壌試料は5つのグループに分類できることが示され、T-RFLP法に比べて土壌粒子の性状やpHに基づき、より詳細なグループに分類できることを見いだしている。両者の結果を比較すると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を立証している。

第6章では、第5章で示された成果に基づき、T-RFLP法と多次元尺度法による遺伝子多様性解析の結果と実際に環境試料から取得した新規遺伝子の多様性を比較し、環境試料のスクリーニングへT-RFLP法を適用することの有効性を検討している。まず、活性汚泥、土壌、堆肥など19種類の環境試料中におけるリパーゼ遺伝子の多様性は、T-RFLP法を用いた解析により、3つのグループに分類できることを示している。また、取得した新規リパーゼ遺伝子の多様性は4つのグループに分類でき、そのうち3つはT-RFLP法を用いた解析によるグループ分けとほぼ同様であり、両者に対応関係があることを明らかにしている。新規遺伝子取得を目的とした環境試料のスクリーニングにT-RFLP法を適用する手法を確立したことは、近年注目されているメタゲノム解析技術の進展に大いに寄与できると考えられる。

第7章では、本論文の統括および展望を記述している。

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ている。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、環境微生物を利用したバイオテクノロジーの発展に幅広く貢献できるものと考えられる。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。

2008年2月

審査員	(主査)	早稲田大学教授	博士(工学) 東京大学	常田 聡
		早稲田大学教授	工学博士(早稲田大学)	酒井清孝
		早稲田大学教授	工学博士(早稲田大学)	平沢 泉