

氏名	吉本 拓矢
学位の種類	博 士（農学）
学位記番号	博 甲 第 9 0 8 5 号
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	土壤微生物集積ツール “鏝” の開発と応用

主査	筑波大学教授	博士（学術）	中島 敏明
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	山田 小須弥

## 論 文 の 要 旨

環境中の99%以上の微生物は現在の技術で培養することができない難培養性微生物であるといわれている。これまで、この未利用である99%以上の微生物を利用可能とするため、新規培養技術の開発が進められており、近年、その一つである*in situ*培養法が注目を集めている。本技術は、環境サンプルから単離した微生物細胞を当該環境下で培養する技術であり、難培養性細菌においても培養が可能になるという報告がある。

著者は、この*in situ*培養法を有用微生物のスクリーニングや化学物質の環境影響評価に応用するため、特定の条件を付加した*in situ*培養法を効果的に行える新規土壤微生物集積法を考案し、鏝（やじり）と名付けたツールの開発・検証を行った。

第1章で、著者は難培養性微生物についてその歴史と研究の経緯、メタゲノム解析による最新の研究等を俯瞰し、これを有用微生物のスクリーニング等に用いる場合の問題点やこれまでの試み、化学物質の微生物生態系への影響評価に関する難培養性微生物の取り扱い等について総合的に論じている。

第2章では、著者は*in situ*での土壤微生物集積法のために新たに考案した“鏝”の開発を行った。鏝は不活性な多孔質構造素材（素焼きの土器）で作成されており、微生物の集積を可能とするために、鏝の内部を空洞にすることで炭素源等の各種試料の添加を可能とした。内部に試料を添加した鏝を土壤に埋設することで、鏝の周囲の限定された範囲のみが試料の影響を受け、特定の微生物が*in situ*で増殖または、試料に引き寄せられるというモデルを提案している。鏝は極めてシンプルな作りをしており、誰にでも容易に扱うことができるという特徴を持つ。

第3章で著者は、*in situ*微生物集積における鏝の有効性を示すため、試作した鏝を用いて脂溶性のラードを試料とした油脂分解菌の集積を実施した。ラードを直接土壤に添加した実験区と比較し、鏝を用い

た実験区では、鏝周辺土壌により多種の微生物が集積されていることをT-RFLP解析により示した。また、各サンプルについて従来法（平板培養）でも検討を行い、鏝を用いることで多種類かつ多量の油脂分解菌を集積可能であることを示した。

第4章において、著者はこれらのデータを元に問題点を洗い出し、改良を加えた新型鏝の作成を行った。試料として水溶性のフェノールを用い、試料の拡散状態や鏝自体の微生物への影響についてDGGE及びT-RFLP解析により詳細に検討を加えた。その結果、試料を直接添加した場合とくらべて土壌への浸透が緩やかであるため、試料が長期間にわたって鏝周辺にとどまること、また鏝自体の周辺微生物への影響は無視できることを明らかにした。

第5章で著者は、鏝が土壌微生物の集積のみならず、効率的なバイオレメディエーションに向けた予備調査にも応用可能と考え、これを検証した。環境汚染物質としてフェノールを用い、これを添加した鏝を土壌に埋設し、2週間ごとに計8週間鏝周辺土壌のフェノール濃度・微生物叢・phenol monooxygenase 遺伝子量を調査した。フェノール濃度は、鏝埋設後2週間目にフェノール濃度が約300 ppmに達し、十分な汚染区を構築した後、徐々に減少し、その浸透範囲は鏝から約3cm未満の限られた範囲にとどまることを明らかにした。また、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析結果より、フェノール濃度の減少に伴い、フェノール分解菌として知られる*Bacillus*や*Streptomyces*などの細菌の優占化が確認できた。さらに、定量PCRによりphenol monooxygenase 遺伝子を定量したところ、試験期間で約2倍以上に増加していた。これより、鏝を用いることで、少量の環境汚染物質で環境負荷の低い、低コストな実サイトでのバイオレメディエーションに向けた評価を行えることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

環境中から培養を介さず直接回収したDNA(メタゲノム)の解析技術の進展によって、これまで研究対象外であった難培養性の環境微生物へのアプローチが可能になった。しかし、本技術をメタゲノム中からの有用遺伝子の取得（メタゲノムスクリーニング）に直接応用しようとすると、膨大なライブラリーが必要となる。これを軽減するためには、目的の遺伝子を有する微生物の*in situ*での集積が効果的であることが以前より指摘されてきた。また、この手法はバイオレメディエーション実施時の環境影響評価に用いるために必要なマイクロコズムの構築にも応用できる。著者は、*in situ*微生物集積におけるツールとして鏝（やじり）を提案した。この鏝に試料を染み込ませ、土壌に突き刺すことによって、試料を鏝内部から表面へ徐々に浸透（徐放性担体）させる。これによりメタゲノムスクリーニングの問題点であった特定機能を持つ微生物の集積を*in situ*で行えるようになり、スクリーニング効率を飛躍的に高めることに成功している。さらに、各種化学物質の微生物叢への影響評価を環境負荷を最小限にしつつ効率的に行うことも可能にした。これらの成果は学術的にも高く評価できる。

平成31年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。