

氏名(本籍)	関口博之(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2806号
学位授与年月日	平成14年3月25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	農学研究科
学位論文題目	Bacterial Community Structure along with the Changjiang River and in the Adjacent Estuary, East China Sea (長江流域とその河口域の東シナ海における細菌群集構造)
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 農学博士 小林 達 彦
副査	筑波大学教授 農学博士 松尾 勝
副査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男

論文の内容の要旨

本研究は、長江流域とその河口域にある東シナ海における細菌群集構造を明らかにする事を目的としている。

まず、東シナ海に設定した調査地点に於ける細菌群集構造を明らかにするため、海水試料より全DNAを直接抽出して細菌の16SrRNA遺伝子(16SrDNA)領域をPCRによって増幅し、得られたDNAについてRFLP(制限酵素断片長多型)パターン解析を行った。その結果、長江からの淡水の流入を反映した細菌群集組成が示され、本調査点が今後ダム建設による影響を評価するに適している事を確認した。次いで、本調査点の細菌群集構造を詳細に解析するため、海洋細菌用平板寒天培地により単離した細菌について、各種炭素源酸化能のパターンに基づく多様性解析を行った。また、培養操作を必要としない分子生物学的解析法として、PCRによって得られた16SrDNAのクローンライブラリーを作成し、その塩基配列から細菌群集組成を解析した。その結果、培養可能な細菌は多様性に乏しくて偏った組成を示し、また、分子生物学的な手法により詳細に細菌群集を解析できる事が明らかとなった。さらに、16SrDNAのクローンライブラリーには長江の河川水に由来すると考えられる淡水性の細菌クローンも含まれており、本調査点が、河川より流入する淡水の影響を評価するに適した場所である事を再確認した。以上の結果より、各種炭化水素化合物を分解できる *Alteromonas macleodii*、及び光合成経路を有する *Roseobacter litolaris* が本調査点の優占種であり、これら菌群が物質循環に深く関与していることが推察された。

一方、長江本流においても調査を行った。河川流に沿って採取した河川水試料を用い、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)および16SrRNA遺伝子のクローンライブラリー法による細菌群集構造の解析を行った。DGGEバンドパターンのクラスター解析及び主成分分析を行った結果、長江の細菌群集構造は中流域に位置するハン陽湖の影響を受けていること、また、長江の細菌群集構造は上流から下流にかけて徐々に、且つ連続的に変遷していることを明らかにした。さらに、16SrDNAクローンライブラリー法による細菌群集組成の詳細な解析を行った結果、上流で優占した *beta-Proteobacteria* が中流と下流では大幅に減少し、一方、上流では小数であった High G + C Gram positive bacteria が下流では増加したことが明らかとなった。これより、上流域においては *beta-Proteobacteria* が初発の炭素源を基質として利用し、下流域で High G + C Gram positive bacteria が低分子化された炭素源を資化して増殖し、この結果、2つの細菌群は利用炭素源を介して互いに拮抗的な関係で生育・分布する事が示唆された。さらに、上流域から下流域にかけて減少した細菌群には、窒素循環に関与している細菌と系統的に同一のク

ローンが多数含まれており、上流域においては亜硝酸濃度の変化が大きいことと関連しているものと考えられた。

以上、長江および東シナ海の細菌群集構造について、培養法及び分子生物学的手法を用いて解析を進め、これまで未知であった東シナ海や世界的大河川である長江の特徴的な細菌群集構造を初めて明らかにした。これらの研究成果は、人為的な環境変化が河川・海洋微生物生態系に与える影響を評価する上で重要な知見である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

中国の長江では、水害防止、流域開発、電力供給等の目的で世界最大級の三峡ダムの建設が行われており、将来的に、長江流域及び河口域の東シナ海に流れ込む栄養塩類および化学物質の量的・質的变化が容易に予想され、生態系への影響が危惧されている。このような社会的背景を受けて将来予測を行うために、本研究では、河川や海洋などの水域の生態系において物質循環の制御要因として機能していると考えられる細菌に着目し、その分布・挙動に関する基礎的知見を得るために行われた。すなわち、長江流域および河口域の東シナ海における細菌群集構造を明らかにする事を目的としたものである。

長江河口域の東シナ海の適正な地点に設定された調査点に於いて、培養法及びPCR-16SrDNAクローンライブラリー法を用いて細菌群集構造を解析し、各種炭化水素化合物を分解する *Alteromonas macleodii*, 及び光合成経路を有する *Roseobacter litolaris* が有占種である事を明らかにした。また、これら優占種は当海域における物質循環に深く関与していることを推定し、多くの新しい知見を得ている。一方、長江流域の細菌群集構造についても解析を行い、その結果、上流から下流にかけて徐々にではあるが連続的に細菌種組成が変化し、且つ、上流域では beta-*Proteobacteria*, 下流域では High G + C Gram positive bacteria が増加し、それぞれの炭素源の利用パターンの相違による棲み分けを仮設した。また、窒素循環と関連の深い細菌群についての流域変動を明らかにし、将来、三峡ダムの建設に伴って栄養塩濃度及びN/P比の変化等が予想されることから、これらの知見は極めて興味深い。

以上のように、本研究は、これまで未知であった東シナ海や世界的大河川である長江の細菌群集構造を初めて明らかにし、得られた成果は今後の細菌群集構造変化を観察する際の重要なベースラインとなり、この役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。