

[256]

氏 名 (本籍)	陳 ^{ちえん} 剛 ^{がん} (中 国)		
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5407 号		
学位授与年月日	平成 22 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	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Study on Community Structure and Distribution of <i>Archaea</i> in Western Subarctic Pacific and Quantitative Bias in qPCR Analysis with Different Archaeal Primers (西部北太平洋における古細菌群集構造分布と異なるプライマーを用いた定量 PCR 解析時の定量的バイアスに関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	佐 竹 隆 顕
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 (農学)	北 村 豊
副 査	筑波大学准教授	博士 (学術)	中 島 敏 明

論 文 の 内 容 の 要 旨

海洋中の微生物、真正細菌および古細菌群集は、食物連鎖中で分解者として重要な役割を担っており、海洋物質循環の主要な駆動者であることが知られている。これらの細菌群集は様々な代謝機能を持ち、分布する場の環境因子と強く影響し合っていることから、群集構造の違いにより全体の物質収支が異なる。従って海洋中の物質循環を定量的に算出するには、これら細菌群集と様々な環境因子との微細な相互作用を明らかにしなければならない。そのためには、海洋細菌群集に関する詳細な分布構造解析を行い、群集を構成する種類やその細胞密度を求めること、定量的評価が可能な解析手法を確立すること、が必要である。特に海洋古細菌群集に関しては、1990 年代に分子生物学的手法を用いた研究により海洋有光層下に浮遊性海洋古細菌の存在が普遍的に確認されるまでは、温泉や高塩分環境、熱水噴出孔周辺など、極限といわれる環境にのみ存在するものと考えられていた。さらに 2000 年以降の分子生物学および同位体分析化学を利用した研究により、古細菌の中でも非高熱性のクレナーキオータが、海洋深層中細菌群集の 1/3 以上を占める群集であること、50%以上の海洋クレナーキオータが化学合成独立栄養代謝をおこなっている可能性があること、などが報告されている。しかしながら海洋細菌群集、特に古細菌群集に関する定量的研究は、まだほとんど行われておらず、重要な研究課題と認識されている。

本研究は、海洋における物質循環研究に資する微生物情報を得ることを目的に、世界の海洋の中で最も一次生産力の高い海域である西部北太平洋 (WSP) の真正細菌および古細菌群集の分布構造解析を、16S rDNA 部分塩基配列に基づく系統解析、定量 PCR 法、直接蛍光顕微鏡による直接計数法を用いて行った。また、本研究において、主要な手法として用いた定量 PCR に関して、これまで誰も確認していなかった既存の様々なプライマーセットに関する詳細な実験条件検討・解析を実際の定量 PCR およびコンピュータ (PC) を用いて評価した。本研究で対象とした WSP は、高栄養塩・低クロロフィル濃度という特徴を有し、ベーリング海から親潮を介して冷たい海水が輸送されている海域である。同緯度帯にある東部北太平洋では、細

菌群集構造に関する詳細な研究が行われているが、WSP においては、それらの研究、特に古細菌群集構造に関する詳細な研究は行われていない。

本研究ではまず、WSP における古細菌群集構造について、16S rDNA 部分塩基配列を用いて系統解析を行った。その結果、WSP では地点や深度により、古細菌群集構造が明瞭に異なることが判明した。全 24 の OUT の内 71% に相当する 17 の OUT は、それぞれの水深に特異的であった。また、表層の全ての OUT は、他の水深では検出されなかった。本研究で明らかにした WSP の古細菌群集構造は、東部北太平洋のそれとは大きく異なっており、海域により古細菌群集構造が異なっていることを示している。WSP 内調査点 (St.K2) 表層においては Marine group II ユーリアーキオータに分類される配列が 77% 以上あり、その割合は水深が深くなるにつれ減少した。一方、表層では 23.9% の割合であったクレンアーキオータに分類される配列は、水深が深くなるにつれその割合が増加した。また、OUT を利用した多様性解析から、WSP では中深層が最も高い古細菌群集の多様性を有していることを明らかにした。

次に、定量 PCR において真正細菌および古細菌群集量の定量的解析用に使用されている様々なプライマーセットに関する評価を行った。その結果、用いるプライマーにより、同一試料による定量 PCR でも、明瞭な数値の違いや極端な過小結果を生じることがあることが判明した。その理由として、使用するプライマーによっては、テンプレート DNA との結合部位近傍で 2 種類の特異的 2 次構造が形成されている可能性があることを明らかにした。検討の結果、古細菌群集の定量 PCR には A109F1/A915R のセットを用いるのが最適である、と結論づけた。

WSP の細菌密度について直接計数法を用いて測定した結果、WSP 各地点での細菌密度は、表層 200 m までは 10^5 cells mL⁻¹、それ以降は水深 700 m までに急激に減少した後、海底まで 10^4 cells mL⁻¹ オーダーで変動した。また、真正細菌および古細菌群集の垂直分布に関して、それぞれの 16S rRNA 遺伝子数を標的とした定量 PCR により測定した結果、真正細菌、古細菌とも表層で最大値を示し、水深が深くなるにつれ減少するパターンを示した。また、他の海域での研究結果と同様に、水深が深くなるにしたがい古細菌の割合が増加することが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、海洋における物質循環研究に資する微生物情報を得ることを目的に、世界の海洋の中で最も高い一次生産力を有しているにもかかわらず、微生物群集構造に関する研究が行われていない西部北太平洋の微生物群集構造の詳細な研究を行ったものである。また、微生物群集の定量的解析で主手法として汎用利用されている定量 PCR について、既知プライマーセットの定量性に関して同一試料を用いて詳細に比較・検討を行い、解析に最適なプライマーセットの選定ならびにその最適使用条件を求める手法を提案している。

その結果、西部北太平洋の真正細菌および古細菌群集の分布構造について、16S rDNA 部分塩基配列に基づく系統解析、定量 PCR 法、細菌密度測定のための直接蛍光顕微鏡計数法のそれぞれの手法を効果的に使用し世界で初めて詳細に明らかにしている。西部北太平洋では、地点や水深により細菌群集構造が大きくこととなっていること、表層においては Marine group II のユーリアーキオータが、水深が深くなるにつれてクレンアーキオータの割合が高くなることを明らかにしている。また、中深層の細菌群集構造が最も多様性が高いことも明らかにしている。定量 PCR のプライマー選択に関して、これまで誰も行っていない詳細な解析を行うことで、使用プライマーによっては過小評価結果しか得られないこと、その原因としてテンプレート DNA とプライマーとの結合部位近傍で 2 次構造を形成している可能性があることを明らかにしている。

以上の知見は、これまで微生物群集構造に関する詳細なデータの空白海域であった西部北太平洋における初めての定量的情報を提供している点で極めて重要であり、本研究で得られた成果は、今後の海洋微生物研

究に大いに貢献するものであるといえる。また、定量 PCR 実験時の度重なる失敗と蛍光プローブ法 (CARD-FISH) との真正細菌、古細菌数の差に関する考察から明らかにした定量 PCR 使用プライマーに関する詳細な検討により得られた結果も、今後の環境微生物の定量評価研究へ大いに貢献するものであることが高く評価される。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。