

氏名(本籍)	はやし 林	あらた 新(長野県)	
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博甲第4467号		
学位授与年月日	平成19年5月31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	「餌-昆虫-腸内微生物叢」系を用いた 新規微生物スクリーニング法の開発とその利用		
主査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	農学博士	土居修一
副査	筑波大学助教授	農学博士	青柳秀紀

論文の内容の要旨

純粋培養技術を基礎とした従来の微生物スクリーニング法では、自然界から新規な有用微生物を獲得することが困難になりつつあり、この現状をブレイクスルーする事が、微生物関連産業で強く求められている。そこで、自然界の複合生物系の中で働く微生物に着目し、それらを積極的に制御して利用する、新規な微生物スクリーニング法の関連を試みた。本研究では昆虫と腸内微生物の共生系に着目し、この共生系を「餌-昆虫-腸内微生物叢」系という一つのシステムと捉え、それを活用する事を考えた。昆虫の腸内は、時間の経過とともに餌成分の分解能が低く増殖能の低い微生物が wash out されるのに対し、餌成分の分解能および増殖能が高い微生物は腸内に滞留し濃縮されることが推定される、一種の連続培養系として捉えることができる。昆虫に与える餌成分をコントロールすることにより、検出限界以下の低濃度であった餌成分分解微生物を検出可能な濃度まで腸内に濃縮し、効率的にスクリーニングする方法を開発した。

はじめに、腸内に原生動物と多種の細菌が共生する下等シロアリのイエシロアリ (*Coptotermes formosanus* Shiraki) と腸内微生物叢の共生関係を利用した微生物スクリーニング法の開発を行った。*C. formosanus* が摂食する木材(アカマツ)に代えて、難分解性で lignin 関連化合物の phenol を 100mg/l 含む人工餌を作製し、*C. formosanus* に摂食させた。*C. formosanus* は phenol の毒性に対して個体差が存在した。木材あるいは phenol 人工餌を摂食し生存した *C. formosanus* の腸内微生物叢から、phenol (500mg/l) を単一炭素源として含む寒天培地を用いて phenol 分解菌のスクリーニングを行ったが、寒天培地上に生じた colony の 90% 以上は phenol 分解能を示さない phenol 耐性菌であった。そこで、phenol 分解菌のみをスクリーニングするために、寒天平板培養法に代えて membrane filter 法を用いた結果、木材摂食の *C. formosanus* からはほとんど colony が生じなかったのに対し、phenol 人工餌摂食の *C. formosanus* では腸内微生物叢が大きく変化し、多数の colony (2.8×10^3 CFU/gut) が生じた。また、その全てが phenol 分解能を有していた。以上の結果から、phenol 人工餌摂食によって phenol 分解菌が *C. formosanus* の腸内に濃縮されることが明らかとなった。さらに、全ての phenol 分解菌の colony を回収して PCR-DGGE 解析 (PWPCR-DGGE 法) を行った結果、木材摂食の *C. formosanus* から得られた phenol 分解菌は、わずか3種類であったのに対し、phenol 人工餌摂食の *C.*

formosanus からは9種類の phenol 分解菌が得られ、本法の有用性が実証された。

次に、本スクリーニング法の普遍性を検討する事を目的に、*C. formosanus* とは異なり、腸内に細菌のみが共生する高等シロアリのタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis* Shiraki) を用いて検討を行った。木材あるいは50mg/lの phenol を含む人工餌を7日間摂食し、生存した *N. takasagoensis* 腸内から membrane filter 法を用いて phenol 分解菌をスクリーニングした。その結果、木材摂食の *N. takasagoensis* からほとんど colony が生じなかったのに対し、phenol 人工餌摂食の *N. takasagoensis* からは、多数の colony (3.9×10^5 CFU/gut) が生じた。さらにPWPCR-DGGE 解析を行った結果、木材摂食した *N. takasagoensis* から分離された phenol 分解菌の種類(7種類)よりも、多種類の phenol 分解菌(11種類)が phenol 人工餌摂食の *N. takasagoensis* から分離された。また、本法により *N. takasagoensis* から得られた phenol 分解菌と *C. formosanus* から得られた phenol 分解菌は全く異なるものであった。以上の結果より、「餌-昆虫-腸内微生物叢」系を用いた微生物スクリーニング法が *C. formosanus* および *N. takasagoensis* の2種の昆虫において適用可能な応用性の高い方法であることが示された。

本スクリーニング法は、腸内微生物叢を有する他の昆虫にも適用できる可能性があり、これまで獲得が困難であった検出限度以下の低濃度の目的微生物を、餌成分をコントロールする事により昆虫腸内に濃縮し、効率的に獲得できる可能性がある。本法は、新規有用微生物の獲得が切望されている微生物関連産業の活性化に大きく貢献することが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

現在、微生物関連産業において、純粋培養技術を基礎とした従来の微生物スクリーニング法では自然界から新規な有用微生物を獲得することが困難になりつつあることが大きな問題となっている。本研究は、この現状を打破する事を目指し、昆虫と腸内微生物叢の共生系を「餌-昆虫-腸内微生物叢」系という一つのシステムとして捉え、そのシステムを活用した新規な微生物スクリーニング法の開発を行った。ここでは、昆虫の腸内を一種の連続培養系として捉え、昆虫が摂食する餌成分を自由に制御できる人工餌を作製し、昆虫に摂食させた。その結果、通常は検出限度以下の低濃度であった、餌成分分解能と増殖能が高い腸内微生物を、検出可能な濃度にまで腸内に濃縮させることができ、効率的なスクリーニングが可能となった。实例として、腸内に3種類の原生動物と細菌叢が共生している下等シロアリの *C. formosanus* と、細菌叢のみが共生している高等シロアリの *N. takasagoensis* の2種類の昆虫を対象に、難分解性で lignin 関連化合物である phenol を含む人工餌を用い、phenol 分解菌を腸内に濃縮させる事により、多種類の phenol 分解菌を効率的にスクリーニングできることを示した。

本研究で開発した新規スクリーニング法は、従来の純粋培養を基盤としたスクリーニング法の問題点を打破し、今後、新規な有用微生物の獲得が期待される。本法は、現在、閉塞状態にある微生物関連産業の活性化に大きく貢献することが期待され、その実用性および応用性は広く、高く評価できる。

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。