

氏名(本籍)	ま ゆみ だい すけ 眞 弓 大 介 (熊本県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 5036 号		
学位授与年月日	平成 21 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	メタゲノムスクリーニングにおける標的微生物ゲノムの集積法の効果とその応用		
主 査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭
副 査	筑波大学准教授	博士(学術)	中 島 敏 明
副 査	筑波大学教授	農学博士	杉 浦 則 夫
副 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

メタゲノム解析技術とは直接環境中から DNA を抽出し、それについて解析を行う手法である。この手法では培養を介さないため、如何なる細菌についてもアプローチが可能である。近年、このメタゲノム解析技術を駆使して環境中から直接的に多くの有用遺伝子が取得されている。

メタゲノムを対象として目的遺伝子のスクリーニングを行う場合、環境試料の選択と目的遺伝子の集積が重要である。特に、目的遺伝子の集積は後のメタゲノムライブラリーからのスクリーニングにおける効率化に強く影響する。しかし、メタゲノムスクリーニングに効果的な集積法は未だ確立されていない。そこで本研究ではメタゲノムスクリーニングの効率化を目指し、*in situ* 集積法と分離集積法を考案し、その効果を検証することとした。本研究では初めに、*in situ* 集積法を用いたポリ乳酸 (PLA) 分解酵素遺伝子の取得を行い、次に DNA-stable isotope probing (SIP) による分離集積法を用いたメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) 遺伝子の探索を行った。

PLA 分解酵素遺伝子の取得において、高温コンポストに埋設した PLA ディスク表層からメタゲノムを取得する *in situ* 集積法を適用した。取得したメタゲノムはその多くが *Firmicutes* 門に属する細菌ゲノムにより構成されており、それより構築した 40,000 株のライブラリーからのスクリーニングの結果、3 種の PLA 分解酵素遺伝子を取得した。これら 3 種の PLA 分解酵素は PLA だけでなく PBS, PES など様々な生分解性プラスチックも分解するエステラーゼ遺伝子であった。それらのアミノ酸配列に基づいたエステラーゼの系統分類を行ったところ、取得した PLA 分解酵素のうちの 1 種、PlaM4 は *Bacillus* 属細菌が有する耐熱性リパーゼと近縁であることが明らかとなった。PlaM4 の詳細な性質を解析したところ、本酵素は 50℃、1 時間の熱処理に対しても高い安定性を示す強力な PLA 分解酵素であった。一方で、他 2 種の PLA 分解酵素、PlaM7 や PlaM9 についてはこれらに近縁な既知遺伝子が存在しないことから新規酵素遺伝子であることが示唆され、本研究においてもメタゲノムスクリーニングの有効性が実証された。以上の結果から、本研究で適用した *in situ* 集積法は目的遺伝子の新規性を損なうことなく、効率よく目的遺伝子を集積できる手法であることが明らかとなった。

しかし、*in situ* 集積法は標的微生物の集積に固体基質が不可欠である。そこで本研究では固体基質を必

要としない集積法として DNA-SIP を用いた分離集積法をメタゲノムスクリーニングに適用し、その効果を評価した。スクリーニング対象としてはメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) 遺伝子を対象に、水田土壌を DNA-SIP に供し標的微生物であるメタン資化性菌ゲノムの集積を行った。密度勾配超遠心後に得られた ^{13}C -DNA について 16S rRNA 遺伝子に基づいた多様性解析を行ったところ、メタン資化性菌とメタノール資化性菌の存在が示された。さらに、Real-time PCR によるメタン資化性菌ゲノムの定量解析を行った結果、 ^{13}C -DNA は少なくともその 60% 以上がメタン資化性菌由来であった。水田土壌中においてメタン資化性菌は全細菌の 1% 弱しか存在しないことを考慮すると、DNA-SIP による分離集積法は極めて効果的な集積法であることが明らかとなった。一方、目的の MMO 遺伝子の 1 つ、pMMO 遺伝子の多様性をクローンライブラリー解析により評価した結果、 ^{13}C -DNA は幅広い pMMO 遺伝子の多様性を有しており、さらには未だ培養法により単離取得がされていない pMMO 遺伝子も存在していた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

メタゲノムスクリーニングの効率化を目的に一般的に行われる集積培養はメタゲノムの多様性を極度に減少させ、目的遺伝子の新規性を乏しくさせることが以前より指摘されてきた。一方、本研究で考案した集積法は共にメタゲノムの多様性を減少させることなく、目的遺伝子を効果的に集積させた。これらの集積法は目的に応じて使い分けることが可能であり、メタゲノムスクリーニングの効率化に大きく貢献すると考えられる。

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。