

氏名(本籍)	や 八	わた 幡	ゆたか 穰(鳥取県)
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第5015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	バイオフィルムの三次元構造と代謝の経時的解析手法の開発		
主査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学准教授	博士(工学)	野村暢彦
副査	筑波大学教授	農学博士	星野貴行
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	高谷直樹

論文の内容の要旨

バイオフィルムは人間社会において有用・障害の二面性を持って密接に関わっており、その代謝活動は地球規模の生態系においても相応の役割を果たしていると予想されている。しかし、バイオフィルムが形成する様々な立体構造が、バイオフィルムの代謝活動にどのような影響を与えているかについては殆ど解明されていない。そこで本研究では、基質消費、可溶性代謝産物、ガス状代謝産物およびバイオフィルム構造を同時に経時観察するための技術開発を行った。

まず、上記技術開発を行うにあたって以下の2つの大きな障害、すなわち①バイオフィルム構造の可視化に関する問題、と②バイオフィルムからのガス状代謝産物の捕集と分析についての問題、が存在することを明確にした。次いで①への対策として、バイオフィルムの立体構造を損なわずに観察する新しい手法を開発しその有用性について検証を行った。既存の顕微鏡法では発光遺伝子を用いるため、形質転換系の確立した微生物が対象で穏和な環境で培養されている場合にのみ非破壊的にバイオフィルムの3次元構造を可視化できる。これに対し、本論文では形質転換を行わない、あるいは形質転換系の知られていない微生物によるバイオフィルムや、極端な環境で培養されているバイオフィルムであっても非破壊的に可視化が可能である COCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy) 法を開発し、本法がより広範な環境及び微生物種においてもバイオフィルムの立体構造に関する経時的研究を可能にするツールである事を立証した。

次いで②の技術的問題に対処するため、非破壊的な観察と同時にバイオフィルムから発生するガス状代謝産物を経時的に捕集分析できる新規な手法 AFGAS (Anaerobic Flow Reactor for Gaseous Metabolite Analysis and Structure Observation) 法を開発し、その有用性について立証した。AFGAS 法により、非破壊的な観察と同時にバイオフィルムから発生するガス状代謝産物を経時的に捕集分析できることを示した。最後に、COCRM 法と AFGAS 法を組み合わせる事により、バイオフィルム構造と代謝活性の動的な変化を同時に捉えることが可能である事を示し、本装置がバイオフィルム構造の潜在的な機能解明に寄与する事が期待された。

審査の結果の要旨

バイオフィームは、物質表面に付着した微生物と微生物が生産する EPS (Extracellular polymeric substance) からなる 3 次元構造体を示し、自然界では微生物の多くがバイオフィーム状態で存在して、地球元素サイクルにも大きな役割を果たしている。また、難治性感染症やパイプラインの狭窄の原因になる一方で、その物質変換能力が排水処理や発酵産業などで有効に利用されている存在でもある。バイオフィームは複雑な立体構造を有しているが、バイオフィームの構造と機能の関連については解明されていない。筆者は、バイオフィームの立体構造は代謝効率に影響を与え、その生き残りに関連していると仮説を立て、その検証にバイオフィーム構造の可視化と代謝フロー分析を非破壊的な方法で経時的に行う事を計画した。しかし、このような研究には、2つの大きな技術的障害が存在した。すなわち、①既存の顕微鏡法では、非破壊的にバイオフィーム 3 次元構造を可視化できるのは、形質転換系の確立した微生物が穏和な環境で培養されている場合に限られ、実環境で行われる微生物プロセスの多くはしばしば嫌気環境等の極端な環境で進行し、多くの微生物種が関わるため、それら全ての微生物について形質転換系を構築するのは不可能である。また、②非破壊的な観察と同時にバイオフィームから発生するガス状代謝産物を経時的に捕集分析できる手法は無かった。筆者はこれらの解決法として、COCR 法と AFGAS 法を新たに開発し、その有用性を立証すると共に、両法の併用により *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィームが時間とともに 3 次元構造を形成する過程と、代謝フローを変化させて行く過程を、同時に観察することが可能であることを示し、バイオフィームの生態についての新たな知見をもたらす強力なツールであることを示した。

以上のように、本論文の著者は地道な研究によって世界で初めてバイオフィーム生態の解析手法を開発し、今後の展開が期待されるため高く評価できる。

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。