

氏名 (本籍)	NYO NYO THET (ミャンマー)		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	博 甲 第 6969 号		
学位授与年月日	平成26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	Isolation of Previously Uncultured Rumen Bacteria by Using Modified Media (改良した培地による未培養ルーメン細菌の分離)		
主査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (獣医学)	三森 眞琴
副査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (農学)	櫛引 史郎
副査	筑波大学教授 (連係大学院)	博士 (畜産学)	田島 清
副査	筑波大学教授	Ph.D. (家畜生理学)	田島 淳史

論 文 の 要 旨

ルーメン発酵では細菌、プロトゾア、古細菌、真菌などの多様な微生物で構成されるルーメン微生物叢が飼料を発酵産物へと変換するが、細菌は最も重要な働きをしていることが知られており、反芻家畜の飼料効率を改善することを目的とし、ルーメン細菌群の微生物学的研究が進められてきた。ルーメン細菌の多様性や機能は培養法と非培養法の両方を用いて研究されているが、培養法では約200菌種が単離され、その生化学性状が明らかにされている。一方、16S rRNA遺伝子配列解析などの非培養法による研究は、培養されている菌種以上の多様性をルーメン細菌叢が内包することを示している。分子生物学的手法の進展により、16S rRNA遺伝子配列から決定されるphylo-type数は増大し続けている。しかし、その多くが未培養細菌であることから、これらのphylo-typeの生化学性状やルーメン発酵での機能についての研究は進んでいない。この問題を解決するためには、より多くの細菌株をルーメンから単離し、その生化学性状を調べることが必要である。本研究ではルーメン細菌培養の常法として用いられているロールチューブ法 (RT法) を改良することにより未培養のルーメン細菌を単離・培養し、さらに16S rRNA遺伝子配列解析により菌種を決定することを試みた。

最初に、未培養細菌を単離することを目的とし、培地固化材としてゲランガム (ファイタゲルまたはゲルライト) を含む培地を作成してRT法で用いた。具体的には、従来法である液体基礎培地 (BM) に寒天を加えた培地 (A-BM)、BMの組成から KH_2PO_4 を除き MgCl_2 を加えた改良液体基礎培地 (mBM) に寒天を加えた培地 (A-mBM)、mBMにファイタゲルを加えた培地 (P-mBM)、mBMにゲルライトを加えた培地 (G-mBM) を作成した。ルーメン内容物からこれらの培地を用いてルーメン細菌を単離したところ、207菌株が得られ、それらのうち47菌株が新種の細菌であった。これらの新種の細菌の多くは、A-mBM、G-mBM、P-mBMから得られた。A-mBMとG-mBMから単離された菌株のoperational taxonomic unit (OTU)の多様性はA-BMで単離された菌株のそれよりも有意に高かった。単離菌株のShannon-Wienerの多様度指数はA-mBMで単離された菌株が最も高かったことから、A-mBMは多種類のルーメン細菌を単離することが可能であることが示された。

次に、培地に含まれるリン酸がルーメン細菌の培養に及ぼす影響を調べた。リン酸としては高圧滅菌時における不溶性リン酸塩の形成を避けるためグリセロリン酸を用いた。グリセロリン酸をA-BM、A-mBM、P-mBM、G-mBMに加えた培地 (PA-BM、PA-mBM、PP-mBM、PG-mBM) を作成した。さらに、菌液を接種する時の温度の影響を検討するため、PA-mBMについては56°Cでの接種 (PA-mBM-LT) と60°Cでの接種 (PA-mBM-HT) の2つの実験区を設けた。これらの培地からは265菌株が単離され、それらうち47菌株が新種の菌株であり、それらの多くはPA-BMとPA-mBM-LTから得られた。各々の培地の優勢菌種は異なっていたが、Shannon-Wienerの多様度指数はPA-mBM-LTが最も高かった。各培地の菌種構成をRibosomal Database Project Library Compare (<http://rdp.cme.msu.edu/>) で解析したところ、PA-BMとPA-mBM-HT、PA-mBM-LTとPG-mBM以外の組み合わせで菌種構成が異なることが判明した。これらのことから、グリセロリン酸を用いても未培養細菌の分離・培養が可能であることや植菌温度の違いが分離される細菌種に影響を与えることが明らかになった。

さらに、セルロース分解性ルーメン細菌の培養を改良するために、アゾカルボキシメチルセルロースを添加したA-mBM (CA-mBM) とG-mBM (CG-mBM) を調製し、これらの培地によって129菌株のルーメン細菌

を単離した。これらの菌株のうち、ろ紙分解活性、カルボキシセルラーゼ活性（CMCase活性）、キシラナーゼ活性を示したものは各々51、108、116菌株であった。16S rRNA遺伝子配列解析により、これらの菌株は6つの門に分類され、そのうちFirmicutesに属するものが最も多く、全体の81.4%を占めることが明らかとなった。さらに、全体の19.4%が属レベルで未分類であることも判明した。単離されたStreptococcusの菌株数はCA-mBMとCG-mBMで有意に異なっていた。また、CG-mBMはCMCase活性を示す菌株をCA-mBMよりも多く単離することが可能であることが示された。

本研究において、5種類の寒天培地、2種類のファイタゲル培地、3種類のゲルライト培地は未培養細菌であった細菌の培養化を可能にした。これらの培地により601菌株（172 OTU）が単離され、これらは未分類の属に分類される菌株を含め、6種類の門に分類された。これらの結果は、本研究で開発した培地を用いることで新種のルーメン細菌を単離することができ、培養可能なルーメン細菌を増やすことが可能であることを示している。さらに、本研究で単離された菌株はルーメン細菌研究の基礎的試料として活用されることが期待される。

審 査 の 要 旨

ルーメン細菌の研究は従来の培養法に加え、近年、分子生物学的手法による解析が進展してルーメン細菌に関する膨大なゲノムやメタゲノム情報が蓄積されつつある。しかし、ルーメン細菌の機能をより詳細に検討するには培養菌株を用いた解析が必要とされる。本研究では、ルーメン細菌叢を形成する細菌、特に未培養細菌の培養化による新規ルーメン細菌の取得を試みた。まず、常法として使われているルーメン細菌用培地の改良に取り組み、培地固化剤や培地成分の改変により新たなルーメン細菌用培地を開発し、この培地により未培養細菌であったいくつかのルーメン細菌の分離・培養を世界に先駆けて成功した。次に、培地成分と植菌温度についての詳細な検討を行い、リン酸としてグリセロリン酸を用いても未培養細菌の分離・培養が可能であることや植菌温度の違いが分離される細菌種に影響を与えることを明らかにした。さらに、アゾ-カルボキシメチルセルロースを炭素源とする培地を用いてセルロース分解菌の分離を試み、従来は未培養であったセルロース分解菌を分離・培養することに成功した。これらの研究で得られたいくつかの細菌株は16S rRNA遺伝子の配列解析により未分類の細菌種であったことから、新種の細菌であることが強く示唆された。

ルーメン細菌叢の遺伝学的解析により得られた多量の遺伝子データには未知遺伝子と同定されるものが多数見つかることからより多くの培養可能菌のゲノム情報の取得が望まれている。また、反芻家畜の生産性を向上させるにはルーメン内でより効率的にセルロースを分解するための技術を開発する必要がある。このような背景を踏まえて、本研究では未培養であったルーメン細菌を分離・培養すること成功し、その分類学的位置を明らかにしたことは高く評価できる。さらに、新規のセルロース分解菌を取得したことは反芻家畜の生産性を向上させる技術開発に多大な貢献が期待される。

平成26年1月16日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。