

氏名	清川 達則		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 8154 号		
学位授与年月日	平成 29年 3月 24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	基質表面上における微生物挙動の時空間解析システムの構築		
主査	筑波大学教授	博士 (工学)	野村 暢彦
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	高谷 直樹
副査	筑波大学准教授	博士 (工学)	橋本 義輝
副査	筑波大学助教	博士 (生物工学)	小川 和義

論 文 の 要 旨

様々な環境中において多くの微生物は物質表面に付着したバイオフィームと呼ばれる状態で存在している。バイオフィームは菌体と自身が生産した細胞外高分子物質から構成される高次構造体である。バイオフィームの特徴的な性質はその複雑な構造と密接に関係しているため、バイオフィームの立体構造への理解は基礎面のみならず応用面でも重要視されている。そのバイオフィームの高次構造形成過程を理解するためには、顕微鏡観察による可視化が重要となっている。現在は、市販のガラス素材のバイオフィーム培養デバイスを用いた経時的な顕微鏡観察により、微生物細胞のガラス面への付着から、マイクロコロニーへの成熟、さらにそこからの脱離といった、可視化によるバイオフィーム研究が進められている。これらの手法はガラス系の素材を用いた市販のものを用いるため、バイオフィーム形成の基質がガラス表面に限定されるものである。しかし、実環境においてはガラス表面に限らず様々な物質表面にバイオフィームが形成されているが、金属表面や植物表面上などに形成されたバイオフィームの解析は、電子顕微鏡 (SEM) による観察など経時的な観察ができない手法で行われているのが現状である。また、微生物は植物・動物などの様々な生物体にもバイオフィームを形成するが、それらバイオフィームの顕微鏡観察による可視化はほぼ不可能に近い。

本論文で、清川達則氏は、生物体も含む様々な物質表面上に顕微鏡観察可能な新規デバイスを開発することで、バイオフィームの立体構造のみならず、バイオフィームをはがすことなく付着表面の物質表面の構造までを同時に経時的に三次元構造解析を可能になり、環境中の様々なものに付着しているバイオフィームの経時的三次元構造解析への有効性を検証した。本論文では、第一に、生物表面を含む様々な物質表面においてバイオフィームの非破壊的な顕微鏡観察が可能な新規培養デバイスの開発を行った。従来法では培養デバイスの中にバイオフィームを形成させる物質を浸漬させる手法がとられているため、大きさ等から生物表面

を含む多様な物質表面に適応できない。そこで培養デバイスの中に物質を浸漬するのではなく、発想を転換して、目的の物質の表面に装着出来る培養デバイスの開発を進めた。その結果、金属などの固体から柔らかい生物体表面でも装着可能な培養デバイスの作製に成功した。次に、物質表面とデバイスの付着には化学物質が使用されるため、その毒性試験を行い、各種グラム陽性・陰性細菌の増殖や細胞形態には影響を与えていないことも示した。そして実際に、基質としてステンレスやプラスチック、木材、食肉、植物葉表面にデバイスを装着し、その中に微生物を接種し、それらの表面に形成されるバイオフィルムの三次元構造と同時に基質表面の構造解析に成功した。同じ微生物のバイオフィルムであるが基質の違いによってその三次元構造が異なることが示された。さらに、基質におけるバイオフィルム形成の局在の違いについても、基質の表面の三次元構造とバイオフィルム構造を経時的に同時に観察出来ることより、時系列を加えてより深く考察することが出来ることが示された。また、植物葉の表面に形成するバイオフィルムについても、植物葉表面に存在する細胞およびその構造を同時に観察出来るため、微生物がどの植物細胞上でバイオフィルムを形成しているかを明らかにした。

本論文で構築された新規システムは、生物表面を含む多様な物質表面において、同じ条件で培養したバイオフィルム構造の比較および基質表面の構造自体の同時観察に成功した世界で初めての技術である。この新規微生物バイオフィルム解析システムは、微生物一細胞からバイオフィルムそして基質の同時観察を可能にすることで、動植物を含む様々物質表面と微生物間の相互作用そしてバイオフィルム形成の理解、そしてそれらのバイオフィルム制御技術の開発に向けた非常に強力なツールとなるが期待される。

審 査 の 要 旨

自然界では様々な生物上（内も含めて）や様々な基質上で微生物はバイオフィルムを形成している。しかし、それらの解析手法がないため、現在のバイオフィルムの理解は市販の培養デバイス内のガラス上で形成されるバイオフィルム解析から得られた知見のみしか存在しない。清川達則氏は、生物をはじめとする様々な物質を基質としたバイオフィルム形成を観察・解析出来る全く新しい手法の開発に成功している。そのための新規デバイス開発のみならず、それに対応したイメージング技術の改良にも取り組み成果をあげている。健康・環境・作物生産には微生物バイオフィルムが関与しているがそれらの解析技術がないことがそれらの研究の妨げになっており、本論文の成果によりそれら全てのバイオフィルム解析に大きく貢献することが見込まれる。実際に、植物葉表面上でのバイオフィルム形成の解析に成功し、新たな微生物・植物の相互作用に関する知見も得られている。

以上のように、本博士論文における新規バイオフィルム解析手法の開発とそれによる実証実験は、これまで限定的であったバイオフィルム研究の対象が飛躍的に拡大され、あわせて新たなバイオフィルムに関わる知見が得られることが期待される。これらのことは様々な分野・産業でのバイオフィルムそして微生物制御、さらには基礎研究にも大きく貢献することが見込まれ高く評価出来る。

平成29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。