

氏名	大森 裕子		
学位の種類	博 士 (農学)		
学位記番号	博 甲 第 8166 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	PCR-DGGE解析法の最適化と農地土壌の微生物群集解析に関する研究		
主査	筑波大学教授	博士 (学術)	中島 敏明
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	山田 小須弥

論 文 の 要 旨

農地土壌の評価は物理性、化学性、生物性の3つの観点から評価できる。このうち、物理性および化学性の研究法は古くから確立されていたが、生物性については立ち後れていた。これは土壌生物、特に微生物の分析が培養を介さねばならなかったことと、培養可能な微生物が全体の1%前後に過ぎなかったことが大きな理由である。しかし、1990年代に土壌 eDNA(土壌から培養過程を経ずに得た DNA)を用いた PCR-DGGE (PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)による微生物群集解析法が開発されて以降、生物性の解析が急速に進展しつつある。

これを受けて、日本国内でも土壌細菌、真菌および線虫群集を対象とした PCR-DGGE 標準解析法が開発され、解析事例が蓄積されてきた。しかし、複雑で多様な土壌微生物群集の解明の推進のためにはさらなる制度・再現性の向上が求められる。なかでも、DGGE プロファイルにおけるバンド位置の変動が解析精度を大きく低下させることが次第に明らかとなり、解析法の最適化が必要とされていた。

これらの背景から、著者は PCR-DGGE 解析法の最適化を図り、その解析法を用いて2種の農地土壌の微生物群集解析を行うことを目的として種々の検討を行った。複数ゲルにわたる PCR-DGGE 解析においては、同一バンドであってもゲル間でバンド位置の変動が生じることから、バンドパターンの処理過程で同一バンドとみなすバンドのクラス分け (バンドマッチング) を行う必要がある。そこで解析法の最適化にあたって、まず正規分布に従ったバンド位置データの変動値 (標準偏差) に基づき、変動範囲 (位置許容差) を決定した。次に、過去に取得した多数の DGGE プロファイルのバンド位置情報に基づくバンドの出現頻度分布から、泳動方向上の位置許容差の設定位置を定めた。以上の2値をパラメータとして最適化法を確立した。そして、その最適化法の検証をテストサンプルの2 way クラスタ分析と非計量多次元尺度構成法 (NMDS) によって行った。著者の構築した新規最適化法を用いることにより、要因の各水準間差が明確化され、より確度の高い解析ができることが示された。

次いで、著者は構築した解析法を用いて実際の農地土壌の微生物群集解析を行った。まず、5地点（芽室、福島、つくば、平塚、弘前）の黒ボク土壌の農地を対象とし、複数要因（地点、肥培管理、年度、時期）の土壌微生物群集に及ぼす影響を、それらの DGGE プロファイルから PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance)、NMDS、主成分分析、および 2way クラスタ分析を用いて評価した。その結果、全地点の統合解析では「地点」の群集に及ぼす影響が他の要因よりも顕著に大きいことを明らかにした。一方で、それぞれの地点において、影響を及ぼした要因が異なること、および微生物群集間においても共通する場合と異なる場合があることを見いだした。また、それらの要因と関連の深いバンドを特定している。これらの結果から、著者は地点間における土壌微生物群集の多様性や、要因に対する微生物群集の応答の多様性を示唆している。

次に、著者は自然栽培（無肥料、無化学農薬）管理で 20 年以上経営が成り立っている青森県弘前市のリンゴ園、「奇跡のリンゴ園」（N 園）を対象とした微生物群集解析を行った。これは自然栽培土壌としては世界で初めての検討例となる。対照区として、近隣の慣行栽培園（C 園）を選定し、3年に渡って両園の土壌の化学性と生物性を調査した。その結果、N 園の硝酸態窒素、可給態リン酸が C 園よりも顕著に低く、また N 園の CN 比および定量 PCR に基づく真菌・細菌存在比は C 園より低いことを明らかにしている。同様に DGGE バンドパターンの解析により、N 園の細菌・真菌・線虫群集の Evenness と線虫群集の Richness が C 園より高い傾向にあることも見いだした。さらに、主成分分析により、N 園の真菌・線虫群集の年次変動が C 園より小さく、かつ各バンドのシーケンス解析から両園の特徴微生物の構成に明確な違いがあることを明らかにしている。著者は、これらの結果から両園の土壌微生物生態系の相対的傾向を、土壌微生物生態系の安定性および物質循環速度の観点から考察している。

これらの検討の結果、著者により最適化された PCR-DGGE 解析法の実用性が示されたとともに、農地土壌の生物性理解の加速化に向けた有用な情報が得られた。

審 査 の 要 旨

土壌微生物叢の解析は過去においては培養が必須であったため、解析結果が本来とはかけ離れたものになることが多く、新規な解析法が求められていた。その後、DNA を元にした培養を介さない解析方法が見いだされ、かつそれらを分離・解析する DGGE 法が開発された結果、本分野の研究は飛躍的に向上した。

現在では次世代シーケンサーが実用化され、より精度の高い解析方法も確立されつつあるが、DGGE 法は多くの検体を簡便、かつ安価に扱えるうえ、微生物叢の「変化」を見いだす点においては未だ有利な点も多く、広く利用されている。

著者の研究は DGGE 法の弱点であるゲル間での誤差修正において、多くの実験例をもとに統計解析を駆使してその大幅な精度向上に成功している。さらに、本法を用いて実際の農地土壌の解析を行っており、それらの性質や影響要因などについての検討を行っている。なかでも、「奇跡のリンゴ園」を対象とした微生物群集解析は自然栽培土壌としては世界で初めての検討例であり、本分野の研究の進展に大きく貢献している。

この標準法は筆者の勤務機関において一般に広められており、多くの企業等で標準法として採用されている。また著者自身も講師として普及に貢献している。これらの成果は農地だけでなく様々な自然環境注の微生物叢解析の精度向上に大きく貢献するであろう。以上のように、本研究は基礎・応用の両面において優れた研究であるといえ、博士学位論文にふさわしいと結論づけた。

平成 29 年 1 月 25 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。