

Title	アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性
Author(s)	見坂, 武彦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169334
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	覧 坂 武 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 那 須 正 夫 (副査) 教 授 田 中 慶 一 教 授 宮 本 和 久 教 授 本 田 武 司

論 文 内 容 の 要 旨

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環を通して、生態系を支えている。例えば動植物に由来する有機物を無機化し、栄養塩の再利用を促進している。また農業や合成洗剤など環境中に放出された様々な化学物質を分解し、環境浄化に大きく貢献している。つまり微生物のこれらの働きがなければ、物質は循環せず、生態系の恒常性は維持できないといえる。このため微生物による化学物質の分解性を予測することは、環境負荷の軽減に重要な意味を持ち、日本をはじめ多くの先進国では、化学物質の製造にあたり生分解試験が課せられている。また微生物は分解者として環境中で機能している一方、上位に生物に栄養源として利用され、生産者としての役割も担っている。この概念は microbial loop として1980年代から認識されるようになり、生物圏における炭素の流れを説明する上で必須のものとなっている。

このように環境中の微生物はその存在の重要性が認識されているにも関わらず、群集の基本的情報、すなわち群集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら、いまだ十分には理解されていない。この大きな理由として、現在一般的に用いられている培養法では、環境中のごく一部の細菌しか検出できないことが挙げられ、培養を基本とする手法のみでは、環境中の微生物群集に関する情報が制限される。そのため環境微生物学分野では、培養することなく細菌を検出するための新しい手法の開発が切望され、年々進歩を遂げてきている。

環境中に生息する細菌を培養することなく属種レベルで明らかにする方法として、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH 法) が1990年以降環境微生物学に応用されつつある。しかしながら、FISH 法の検出感度は菌体内の rRNA 含量に依存することから、貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては、その応用が制限される場合が多い。そこで本研究では蛍光基質 HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) および Fast Red TR を用いた高感度な FISH 法 (HNPP-FISH 法) に着目し、河川水中の生理活性の低い細菌の群集構造を解析することを目的として、その最適化を試みた。プローブは水環境に多く生息すると報告されている 5 グループの細菌の rRNA を標的とし、そのハイブリダイゼーションの条件を30種の標準株を用いて決定した。

次に本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用し、従来法との比較を行った。HNPP-FISH 法では全細菌の約70%の細菌を検出することができたのに対し、寒天平板培養法では約5%、従来法である FITC-FISH 法では約15%であった。このことから本法は従来法に比べはるかに有効な手法であることがわかった。また5種のプローブを用いて群集構造解析を行った結果、有機物汚染の進んだ地点では約50%、汚染の進んでいない地点では25-40%の細菌が

いずれかのプローブとハイブリダイズし、プローブEUB338で検出できる細菌の大部分を同定することができた。本法は淡水環境に生息する細菌の役割や生態学的意義を理解するための基礎となるものと考えられた。

FISH法の検出感度は細菌のrRNA含量に依存することから、細菌の生理活性を知る指標の一つとなる。しかしながら、飢餓状態に入った細菌ではrRNAの半減期は数日であり、FISH法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない。生きている細菌、また高い生理活性を持つ細菌の物質循環における寄与は大きいと推察される。そこでDVC (direct viable counting) 法を行った試料に対しFISHを行い (DVC-FISH法)、東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理活性評価に応用した。本研究では水質汚濁が深刻化しているマレーシアのKelang川およびタイのChao Phraya川、さらに大阪市周辺の都市河川を対象とした。

細菌のrRNA含量を指標としたFISH法およびDVC-FISH法の検出効率の結果から、Kelang川に生息する細菌は河川水中での生理活性が高いこと、Chao Phraya川に生息する細菌は河川水中での生理活性が低いものの、その多くはタンパク合成能を有していることがわかった。Kelang川では水量が少ないにもかかわらず、十分に処理されていない多量の下水が流入している。また処理された下水であっても、塩素消毒が行われずに河川に放流されることから、Kelang川に生息する細菌は生理活性が高いものと考えられた。

細菌群集構造解析の結果から、両河川ともに *Proteobacteria* の beta、gamma サブクラスの細菌が優占し、beta サブクラスが優占する冷温帯の水環境との違いがみられた。また大阪の試料ではDVC-FISHを行うことにより、gamma サブクラスの細菌が多く検出されるようになったことから、これらの細菌は河川水中での生理活性が低いものの、タンパク合成能を保持していることが明らかとなった。一般的にgamma サブクラスの細菌は自然環境中での現存量は少ないと報告されていることから、実際には冷温帯の水環境に生理活性が低い状態で生存していることが推察された。

FISH法を用いて *Bacteroides* グループ、*Escherichia-Shigella* グループの細菌の現存量を検討した結果、Kelang川およびChao Phraya川では、動物消化管由来の細菌が培養法により得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった。消化器感染症の発生を未然に防ぐためにも、Kelang川、Chao Phraya川では、培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする必要があると考えられた。

DVC-FISH法を用いることにより、通常のFISH法では困難であったタンパク合成能を持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となり、本法は水環境の微生物モニタリングに有効な手法であると考えられた。またDVC-FISH法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を検出可能であることから、医療や食品分野、住環境における微生物管理に応用できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環に大きく寄与することにより、地球環境の保全、修復に中心的な役割をはたしている。しかしながら環境中の細菌の大部分は通常の方法では培養が困難であることから、細菌群集の基本的情報、すなわち群集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら、いまだ十分には理解されていない。申請者は培養することなく環境中の細菌の群集構造を解析するために、HNPPおよびFast Red TRを用いた高感度なFISH法の最適化を行った。その結果、生理活性の低い細菌の検出も可能となり、河川水中の細菌を対象とする群集構造解析が飛躍的に進歩した。またFISH法と細菌のタンパク合成能を指標とするDVC法とを組み合わせることにより、通常のFISH法では困難であった細菌群集構造の解析と生理活性の同時評価への道が拓け、水質汚濁が深刻化しているアジア都市河川における微生物モニタリングに応用した。

以上の研究成果は、環境中における個々の微生物の生態を知る基盤となるとともに、特定微生物の生理活性評価法の進歩に大きく貢献するものであり、博士(薬学)の学位論文に値するものと判断する。