

Title	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による地下水中の細菌群集構造解析
Author(s)	岩本, 朋忠
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169330">https://doi.org/10.11501/3169330</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	岩本朋忠
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15367 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	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による地下水中の細菌群集構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫  (副査) 教授 高木 達也    教授 西原 力    教授 宮本 和久

### 論文内容の要旨

過度な人間活動は、地球規模で見られる水環境汚染を引き起こし、我々人類の生存を脅かしている。河川、地下水などの淡水資源の汚染の拡大防止、修復のためには環境負荷の生態系への影響を的確に評価し、根本的な解決を図らなければならない。そのためには、環境負荷の生態系への影響を速やかに評価する必要がある。

生態系の根幹部を構成する細菌は、世代交代時間が短く、多様な機能を持っていることから、環境変化に速やかに応答した群集を形成する。また、その変化は上位の生態系に影響を及ぼす。したがって、負荷に対する細菌群集の応答は、生態系への影響を早期に見出すための、優れた生物指標になり得る。環境負荷の細菌群集への攪乱を客観的・定量的に評価するにあたっては、細菌群集の多様性の変化を解析することが有効になると考えられる。しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できないという手法上の制約や細菌の種の同定は容易ではないという問題から、環境負荷に対する細菌群集の多様性の変化については、十分な解析がなされていない。そこで本研究では、種の同定を行うことなく細菌群集の多様性の変化をゲル上のバンドパターンの変化として解析できる、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) に着目し、環境負荷の地下水中の細菌群集に及ぼす影響評価に適用した。

地下水中には多種多様な細菌が存在するので、その多様性の解析にDGGE法を適用するにあたっては泳動条件の最適化を検討する必要がある。そこで、真正細菌の16S rDNA に特異的なプライマーを用いて標準株、地下水、河川水サンプルより得た16S rDNA断片を分離するための変性剤濃度勾配、および泳動時間の検討を行った。その結果、地下水中の細菌群集構造の解析には、55℃、100V、変性剤濃度勾配45%から65%で12時間泳動が適当であることが示された。

次に、DGGE法を用いて、千葉県君津市で行われたバイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をモニタリングし、処理の細菌群集への影響について調べた。バイオレメディエーションにおいて微生物が汚染物質の浄化の中心的役割を担っているにもかかわらず、処理における微生物の寄与については手法上の制約から、未だブラックボックスとして扱われている。したがって、処理の微生物群集への影響について理解されていないため、バイオレメディエーションの環境、また、生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問題を抱えている。

DGGE法を用いて、バイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化を解析した結果、

メタン注入処理により、細菌群集は一時的に大きく攪乱され、急激な多様性の減少が見られたものの、処理に伴い多様性は元のレベルに回復し、かつ安定することが分かった。また、比較的安定した細菌群集構造が形成された処理45日目以降では、約10-15%のトリクロロエチレンが安定して除去されており、汚染物質の除去と細菌群集の多様性および群集構造の安定性との関係が推察される。

バイオレメディエーションの実施における汚染物質分解菌の挙動を把握することにより、バイオレメディエーションはより確かな技術となる。しかしながら、その挙動については手法的制約からほとんど理解されておらず、効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策を微生物学的側面から検討することができないという問題がある。そこで、本バイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資化菌の挙動を解析するために、タイプIのメタン資化菌の16S rDNAに特異的なプライマー、タイプIIのメタン資化菌の16S rDNAに特異的なプライマー、および可溶性メタンモノオキシゲナーゼをコードしている *mmoX* 遺伝子に特異的なプライマーを用いたDGGE解析を行った。その結果、バイオレメディエーション処理により、メタン資化菌の優占種はタイプIからタイプIIのメタン資化菌にシフトすることが分かった。したがって、バイオレメディエーション処理の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理前から優占種として存在したタイプIのメタン資化菌であり、その後、タイプIIのメタン資化菌が増殖し、より安定したトリクロロエチレン除去に関与したものと考えられる。

今回の研究により、DGGEバンドパターンから多様性指数の算出と類似性評価および強い輝度を持つバンドの塩基配列の決定を行うことで、環境負荷の細菌群集への影響を多様性の変化、優占種の変化、および特定の機能を持つ細菌の挙動として客観的に捉えることが可能となった。

今後、同様の方法で環境と細菌群集構造に関する知見を集積することにより、細菌群集を生物指標とした環境・生態系影響評価の確立に寄与するものと期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

自然環境中の細菌は、生態系の恒常性の維持に大きな役割を果たしており、その生態についての理解を深めることは、環境問題の解決に大きく寄与するものと期待される。そのためには、培養困難な状態にある環境中の細菌を解析するための分子生物学的手法が有効となる。

申請者は、環境負荷に対する細菌群集の応答を客観的・定量的に評価することを目的として、バイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の解析に変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE法)を適用した。数量解析にあたっては、DGGEバンドパターンをデジタルイメージとして取り込み、各バンドの輝度を数値化したのち、多様性指数の算出と多次元尺度法を用いたバンドパターンの類似性評価を行い、環境負荷への細菌群集の応答を細菌群集の多様性の変化として評価した。その結果、バイオレメディエーション処理により地下水中の細菌群集の多様性は一時的に減少するものの、処理に伴い多様性は回復し再び安定することが示された。さらに、DGGEにより分離されたバンドの塩基配列を決定することで、環境変化に応答し優占的に存在する細菌種を明らかにした。

本研究は、バイオレメディエーションの運用にあたって有意義な知見を提供するとともに、環境中の細菌の生態を理解するうえで大きく貢献するものであり、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認められる。