

氏 名 飯島 想

授与した学位 博士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博甲第4161号

学位授与の日付 平成22年 3月25日

学位授与の要件 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 蛍光性代謝産物を指標とした環境微生物の迅速単離法の開発に関する基礎的研究

論文審査委員 准教授 金原 和秀 教授 鈴木 信弘 准教授 且原 真木

学位論文内容の要旨

地球上の微生物の99%以上が培養困難といわれており、新規な機能を持つ微生物資源の獲得は重要な課題となっている。そこで、環境中から生きた有用微生物を、培養を経ずに単離する方法の確立が求められている。本研究は、PCB分解菌、*Comamonas testosteroni* TK102株がベンゼン環のメタ開裂により生成する、黄色のビフェニル代謝産物 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA)に着目して行った。ベンゼン環のメタ開裂酵素と、その前後の代謝関連酵素は、医薬品の合成に利用でき、新規な酵素活性の獲得は、産業的にも重要である。HOPDAは、青色光によって励起され、緑色蛍光を呈することから、HOPDA生成による緑色蛍光で細菌細胞をラベルし、フローサイトメトリ (FCM) を用いて単離する手法の構築を行った。

C. testosteroni TK102株に、基質として2,3-dihydroxybiphenyl (2,3DHBP)を添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞が発光せず、HOPDAの細胞外への流出が観察された。そこで、2,3DHBPの4'位にブチル基を付加し、疎水部位を持つ2,3-dihydroxy-4'-butylbiphenyl (2,3DHBBP)を基質に用いることで、HOPDA誘導体の細胞内への残留性が向上し、細菌細胞の蛍光標識が可能となった。2,3DHBBPは大腸菌のクローンで生成後、抽出・精製し使用した。HOPDAとHOPDA誘導体を、蛍光分光光度計を用いて解析した結果、励起及び、蛍光波長が、FCMで検出可能であった。そこで、HOPDA誘導体を、メタ開裂活性を有する細胞の単離に用いる蛍光指標とした。TK102株を用い、HOPDA誘導体の濃度と反応時間を調節することで、ラベルした細胞をFCM解析で検出し、分取することに成功した。

環境微生物を純粋に抽出する技術を確立するため、土壌粒子を除去する手法を構築した。0.05%のTween 80を含むPBS溶液で土壌を懸濁し、超音波処理後の遠心分離で上清を得た。Histodenzを用いた密度勾配遠心法により、上清中の微生物細胞を高純度に精製し、FCMに供試することに成功した。

地下水サンプルにTK102株を添加し、FCMで単離を試みた。TK102株を含む濃縮地下水サンプルに2,3DHBBPを添加し、FCMを用いて解析を行った結果、蛍光でラベルしたTK102株が検出可能であった。そこで、細胞分取のパラメータを設定し、ラベルしたTK102株の分取を試みた。低栄養のR2A培地で分取細胞を培養後、獲得したコロニーを、MALDI-TOF/MSを用いたりボゾーマルタンパク質の質量解析にて同定した。その結果、環境サンプルから、TK102株を4.1倍に濃縮することに成功した。

論文審査結果の要旨

2月19日に行われた博士論文発表会での発表ならびに質疑応答を受けて、本論文の学位審査を行った。本論文は、PCB分解菌、*Comamonas testosteroni* TK102株がベンゼン環のメタ開裂により生成する黄色のジフェニル代謝産物 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA)に着目して行った。HOPDAは、青色光によって励起され、緑色蛍光を呈することから、HOPDA生成による緑色蛍光で細菌細胞をラベルし、フローサイトメトリ (FCM) を用いて単離する手法の構築を行った。まず、環境微生物を純粋に抽出する技術を確立するため、土壌粒子を除去する手法を構築した。Tween 80を含むPBS溶液で土壌を懸濁し、超音波処理後の遠心分離で上清を得た。Histodenzを用いた密度勾配遠心法により、上清中の微生物細胞を高純度に精製し、FCMに供試することに成功した。また、TK102株に、基質として2,3-dihydroxybiphenyl (2,3DHBP)を添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ、HOPDAの細胞外への流出が観察された。そこで、2,3DHBPの4'位にブチル基を付加し、疎水的性質を持つ2,3-dihydroxy-4'-butylbiphenyl (2,3DHBBP)を基質に用いることで、細菌細胞の蛍光標識が可能となった。HOPDA誘導体を、蛍光分光光度計を用いて解析した結果、励起及び蛍光波長がFCMで検出可能であったことから、メタ開裂活性を有する細胞の単離に用いる蛍光指標とした。TK102株を用い、HOPDA誘導体の濃度と反応時間を調節することで、標識した細胞をFCM解析で検出し、分取することに成功した。次に、地下水サンプルにTK102株を添加し、FCMで単離を試みた。細胞分取のパラメータを設定し、標識したTK102株の分取を試みた。その結果、環境サンプルから、TK102株を4.1倍に濃縮することに成功した。また、本論文で開発した手法の重要性に関して質疑応答を行い、見出した現象の重要性を認識することができた。その結果、行った研究は学位論文として十分価値があると評価された。また、論文で行った研究の周辺分野に関して、質疑応答を行った。学力については、当該分野の知識は十分であり、今後の研究の展開に関して意義ある議論をすることができ、博士号取得者として十分なレベルであることを確認した。論文作成能力に関しては、英語で1編の投稿論文を書いていることから、十分な英語能力を有していることを確認した。以上の結果から、論文は博士(農学)として十分価値があり、学力は博士課程修了者として十分なレベルであるものと判定した。