

環境・生命工学専攻		紹介教員氏名	千石 明
申請者氏名	岡村 恵子		

## 論文要旨(博士)

論文題目	紅色非硫黄細菌の近縁種識別のための分子生物学的技法の開発
------	------------------------------

(要旨 1, 200字程度)

近年、生物学的環境修復や有用物質生産などの様々な生物工学的分野で細菌が利用されている。また利用される細菌は非常に多種に及び、その性質も多様である。この様に細菌を利用する場合、最も基本的な情報として細菌種の正確な分類・同定または細菌の群集構造の把握が必要である。また、これらは迅速で簡便にできることが望ましい。

本研究では、近縁細菌種の正確な識別法として、16S-23S rRNA遺伝子間領域(ITS領域)情報を用いた系統分類法の検証を行った。また新たな群集構造解析法として、ITS領域のDNA断片を用いた交雑形成試験法を検討し、マイクロアレイの作製を行った。ここでは特に、環境微生物のモデルとして紅色非硫黄細菌を用い、以上の検討を行った。(第2章)まず、様々な水圏環境より紅色非硫黄細菌の分離を試みた。その結果、アルファプロテオバクテリア綱に属する多系統の分離株が得られた。特に、温泉微生物被膜、池の底泥、水田底泥からは3種の新規分離菌株を得た。(第3章)さらに、これら新規分離菌株の分類学的評価を行った。その結果、これらは*Rhodoplanes*属の新種および*Acetobacteria*科の新属であることが明らかとなった。(第4章)次に、ITS塩基配列に基づく系統分類法の妥当性を検証した。既往のゲノムデータベースから病原性細菌を主とした13属を抽出し、ITS塩基配列に基づく系統樹と、近縁種識別に有用とされる*gyrB*と*dnaJ*遺伝子の塩基配列に基づく系統樹を作成し、それらの比較を行った。その結果、全ての属において両者の樹形は類似し、識別解像度もほぼ同程度であった。よって、ITS塩基配列に基づく系統分類法は近縁種識別法として妥当であると判断した。さらに、ITS塩基配列の相同性比較による異種細菌間の識別解像度を明らかにするため、ITS塩基配列の相同率とDNA-DNA交雑形成率の比較を行った。これには*Rhodopseudomonas*属を含む4属の紅色非硫黄細菌を用いた。その結果、両者は正の相関関係にあり( $r^2=0.78$ )、異種識別の指標であるDNA-DNA交雑形成率70%は、ITS塩基配列相同率93%に対応した。またここで用いた*Rhodopseudomonas*属細菌については、16S rRNA遺伝子、光合成遺伝子(*pufL*と*pufM*)およびITSの塩基配列に基づく系統解析を行い、各系統樹のクラスターから種の存在数を検討した。さらにDNA-DNA交雑形成率と系統解析による検討から、種の数を決した。その結果*Rhodopseudomonas*属は、従来3種のみが報告されているが、10種に分類可能であることが示された。(第5章)さらに、細菌種の迅速検出・群集構造解析法のため、ITS断片を用いた交雑形成法の検討、これを応用したマイクロアレイの作製を行った。はじめに、ITS断片同士による交雑形成(ITS-ITS交雑形成法)の定量性の検討を行った。供試菌株には4属の紅色非硫黄細菌を用いた。ITS-ITS交雑形成率を、従来のDNA-DNA交雑形成法による値と比較したところ、両者間には高い相関が見られた( $r^2=0.84$ )。このことから、本法により、供試菌株間の系統的類似性が定量化できることが分かった。次に、マイクロアレイの雛形となるマイクロアレイの作製を行った。マイクロアレイには供試菌株のITS断片全長と同時に、ITS領域内の約80塩基をプローブとして固定した。その結果、これら2種プローブの交雑形成シグナルから、標識菌株と標的菌株間の系統的類似性と、標識菌株の定性的な検出が可能となった。以上の知見を利用すれば、迅速かつ信頼性の高い細菌検出または群集構造解析のためのマイクロアレイの開発が可能である。