

論文審査の結果の要旨

氏名 楊 賀

下水処理の場で浄化機能を担っている微生物について、多くの研究が行われており、ウイルスや、特に細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ（ファージ）が微生物群集構造の変動に関与している可能性が指摘されている。しかし、下水処理プロセス中に存在するバクテリオファージについての研究は非常に遅れているのが現状である。

本研究は活性汚泥中の細菌群集構造へのファージの影響を仔細に捉えることを試みた研究である。ファージによって宿主が溶菌される状況を捉えることは、純化された系では目視でさえ確認できるほどであるが、活性汚泥のような混合微生物系ではどの細菌が溶菌されたかを知る手法はほとんど知られていない。本研究では、著者は、ファージが宿主のタンパク質合成系を溶菌の直前まで利用し続けるであろうとの仮説をたて、宿主が溶菌する際に菌体外に放出されるリボソーム中の rRNA 分子を手がかりとして、溶菌される宿主を特定しようと試みている。

本論文は全五章で構成され、第一章では上記仮説を述べた上で、研究の目的と論文の構成を述べている。第二章では関連する文献として下水処理の手法、下水処理に関連するファージについての既往の研究、そして、微生物群集構造やファージを分析するための手法について、レビューしている。第三章は宿主から放出された rRNA を検出するための手法を開発し、第四章では実験室において活性汚泥プロセスを運転し、第三章で開発した手法を用いてファージの挙動と宿主の溶菌について検討した。第五章では論文全体の結論と、今後の展望を述べている。

第三章の前半では、活性汚泥処理水または活性汚泥の上清から細菌細胞をメンブレンフィルターを用いて除去し、そのろ液を直接逆転写 PCR (RT-PCR) 反応の鋳型として、増幅産物を得ることを試みた。25 サイクル程度の RT-PCR 反応を行うと増幅産物が得られた。また、逆転写反応を行わない場合ほとんど増幅産物が得られないことから、上清中の DNA ではなく rRNA が検出されたと判断された。一方、大腸菌と T4 ファージを用いた検討を行い、T4 ファージによって大腸菌が溶菌されると大腸菌の rRNA が菌体外に放出されることを確認した。放出された rRNA の数は、溶菌された細胞一つあたり百コピー程度であった。以上から、ファージによる溶菌によって、上清中に溶菌された宿主の rRNA の量が増加するという仮説が支持され、また、その様子を捉えるための手法を開発することができたとした。

第四章では、実験室で4時間を1サイクルとする回分式活性汚泥プロセスを運転し、第三章で導入した方法を用いてファージに溶菌される宿主を捉えることを試みた。約 50 日に及ぶ運転中、毎日一回処理水および活性汚泥を採取し分

析したほか、一サイクル中で概ね20分ごとに試料を採取・分析する実験をした。毎日の試料の分析結果は本章前半に、また、各サイクルの仔細な分析の結果は本章後半に述べられている。

同章前半では、50日間の運転中、細菌群集構造やファージの構成が運転とともに変化し、また、処理水中のrRNA分子の遺伝子型が変化していくことを示した。一方、同章後半では、ストレスを与えた後にファージDNA濃度の急激な増加が見られた四つのサイクルについて、詳しく解析した結果を報告している。特に、サイクル15では、過負荷を与えた直後にファージDNA濃度が顕著に増加し、また、それまで見られなかったゲノムサイズのバンドが観察された。さらに、上清中のrRNAの遺伝子型からは、同属に属するもののうち特定の操作定義種(OTU)だけが経時的に増加するケースが見いだされ、種特異性が高い現象であることがわかった。上清中のrRNAの種特異的なOTUの存在割合の変化は複数回観察され、好気条件だけではなく嫌気条件下でも観察された。考えられる上清中rRNAの生成要因について検討し、バクテリオファージによる宿主の溶菌が最も有力であるとした。

本研究では上清中のrRNAの生成がファージによる溶菌であるとの決定的な証拠を見いだすことはできなかったが、種特異性が高いことや嫌気条件下でも放出が見られたことから、rRNAの生成要因としてはファージの活動が大きな寄与を占めると考えられ、本研究のようなアプローチは活性汚泥中のファージと宿主の関係を知るための手法となりうるとした。

なお、本論文第四章の一部は共著論文として公表されているが、論文提出者が主体となって行なったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上より、博士(環境学)の学位を授与できると認める。

以上 1,907 字