

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 王 勇

土壤微生物は農耕地の物質循環や環境浄化さらには作物生育において重要な役割を果たしている。しかし土壤中の微生物の99%以上が培養不可能であるため、その存在量や多様性、機能については不明な点が多かった。土壤中に機能している微生物やその機能の主体となる酵素を明らかにするためには、土壤から抽出したRNAを解析する必要がある。しかし土壤に多く含まれる腐植物質が酵素反応を阻害するため、高純度なRNAを得るためには様々な改良が必要である。特に、国内の主要な農耕地土壤である黒ボク土は、土壤RNAの抽出と解析が事実上不可能だった。

本研究ではこうした問題を克服し土壤から解析可能なRNAを抽出する方法を開発するために、(1)滅菌土壤を用いてRNA抽出の基本的なストラテジーを検討すると同時に腐植物質測定法を評価した。(2)次いでこれらを基本として、新たな腐植物質の除去方法を含む土壤RNA抽出・精製方法を確立し、マイクロアレイ解析および機能遺伝子解析に応用して、その有効性を実証した。以下、(1)については2章と3章で、(2)については4～6章で、述べている。

第2章では、ビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株を接種した滅菌畑土壤中の遺伝子発現の検出について述べている。いくつかの市販のキットを組み合わせ、土壤からの新しいRNA抽出方法を開発し、この方法を用いて *R. jostii* RHA1 株を接種した滅菌土壤からRNAを抽出した。定量RT-PCR実験により、ビフェニル分解遺伝子 *bphAa* の発現が、ビフェニルを添加した土壤において誘導されたことを示した。

第3章では、土壤RNA試料中のフミン酸を測定する方法の評価について述べている。腐植物質は少量でも遺伝子発現の検出に影響を与える。しかし、これまで土壤RNAサンプル中に残っている腐植物質を評価する方法はなかった。そこで腐植物質を測定する方法を選択するために、様々なフミン酸の測定方法の感度とDNA、RNAおよびタンパク質の影響を調べた。その結果、RNAサンプル中の腐植物質の量を測定するためには、紫外/可視分光法と蛍光分光法が高い信頼性を有することを示した。以上から、この方法を土壤RNAサンプル中のフミン酸測定に使用することを提案した。

第4章では、土壤RNAサンプルから腐植物質を除去するための条件の最適化について述べている。土壤から抽出したRNAサンプル中の腐植物質を除去するために、土壤中の微生物細胞破碎条件と精製カラムを最適化した。この改良した方法によってフミン酸とフルボ酸を効率的に除去できることを蛍光分光法で確認した。リアルタイムRT-PCR法による検出感度は、以前の抽出方法を使用した場合と比較して10倍に増加した。この方法を用いて、

3-クロロ安息香酸 (3CB) 分解プラスミドで形質転換された *Pseudomonas putida* KT2440 株を接種した 3CB 添加または無添加滅菌畑土壌から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行い、3CB を添加した土壌中での 3CB 分解遺伝子の発現を確認した。以上から、この改良された方法は、土壌中の遺伝子発現を検出するために適していることを実証した。

第 5 章では、滅菌土における *P. putida* KT2440 の遺伝子発現マイクロアレイ解析について述べている。前章で改良した土壌 RNA 抽出方法を用いて調製した RNA が、マイクロアレイ解析に利用可能かどうかを検討した。KT2440 株を接種した 3CB 添加または無添加滅菌土壌から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。3CB 添加、無添加土壌間で発現に有意な変化を示した遺伝子を調べ、安息香酸分解経路に関わる遺伝子の発現が 3CB を土壌に添加することにより最も大きく変化したことを示した。この結果から、改良した土壌 RNA 抽出方法が、土壌中の細菌遺伝子発現のマイクロアレイ解析に適用できることを実証した。

第 6 章では、多様な土壌から RNA を抽出する方法の開発について述べている。これまで黒ボク土から RNA を抽出することは不可能であった。そこで特に黒ボク土から RNA を抽出する方法を検討した。滅菌済みカゼインを含有する抽出バッファーを用いることにより、黒ボク土を含む 8 種類の農耕地土壌から高品質の RNA が抽出できることを示した。この方法で 2 つの黒ボク土からアンモニア酸化細菌のアンモニア酸化酵素サブユニット遺伝子 (*amoA*) 転写産物が検出できた。以上から、カゼインを利用した RNA 抽出法は黒ボク土を含む多様な土壌から RNA を抽出する有効な方法であることを実証した。

以上、本研究は、土壌から高純度な RNA を抽出・精製する方法を確立し、その方法で調製した RNA が、マイクロアレイや RT-PCR-DGGE 法など現在使用されている主要な分子生態学的解析手法に利用可能であることを示した。またその過程で 3CB に対する分解菌の新たな応答を見出し、さらには土壌中で機能する主要なアンモニア酸化細菌の特定に成功した。以上の研究成果の学術的、応用的意義は大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。