

学位被授与者氏名	堺 眞砂美 (Masami Sakai)																																																															
学位の名称	博士 (工学)																																																															
学位番号	博 (一) 第 3 1 号																																																															
学位授与年月日	平成 2 5 年 3 月 2 0 日																																																															
論文題目	珪藻の遺伝子解析とその応用に関する研究																																																															
論文題目 (英訳または和訳)	Study on genetic analysis and application of diatoms																																																															
論文審査委員	論文審査委員会 委員主査 : 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 川上 満泰 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 呉 正行 同審査委員: 福岡工業大学大学院物質生産システム工学専攻教授 三田 肇 同審査委員: 福岡工業大学大学院知能情報システム工学専攻教授 赤木 文男																																																															
論文審査機関	福岡工業大学大学院工学研究科																																																															
論文内容の要旨 (和文)	<p>珪藻は、光合成を行なう単細胞性の藻類である。珪藻は種類によって水質に対する適応性が異なることから、古くから水質との関連が研究されてきた。また、珪藻の細胞は珪酸質の被殻で覆われており、このような生物が作る生体鉱物形成作用 (バイオミネラリゼーション) が新素材開発分野などで注目されている。</p> <p>本研究では、珪藻を用いた生物判定法(DAIpo 法)による水質評価と珪藻群集から調製した DNA を使った PCR-DGGE 法による珪藻群集の解析、そして組換えタンパク質(Silaffin)を用いたバイオシリカの生産について検討を行なった。</p> <p>第 1 章では、本研究の背景として、これまでに報告された珪藻を用いた水質評価や、バイオシリカの利用法について述べ、さらに本研究の目的を述べた。</p> <p>第 2 章では、付着珪藻群集に基づく有機汚濁指数 (DAIpo 法)を用いた、いくつかの池および河川の水質評価について述べた。DAIpo 法は、水中の基質に付着している珪藻を、有機汚濁の適応性により、好清水性種・好汚濁性種・広適応性種に分類し、それらの出現頻度から統計的に解析した値である。好清水性種および好汚濁性種の出現頻度を用いて、DAIpo 値を求める式(1)に代入し計算することができる。</p> $\text{DAIpo 値} = 50 + 1/2 (A-B), \quad (1)$ <p>ここで、A および B は、好清水性種および好汚濁性種の出現頻度の総和を示している。本解析で使用した試料採取地点は、おとめが池、博多川、宝満川、小田川、室見川、高尾川、多々良川およびやな川である。それぞれの水域における珪藻群の解析結果とそれらから求められる DAIpo 値と水質評価を以下の Table 1. に示した。</p> <p><b>Table 1. 福岡県内の池および河川における珪藻調査と水質評価</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>採取地点</th> <th>おとめが池</th> <th>博多川</th> <th>宝満川</th> <th>小田川</th> <th>室見川</th> <th>高尾川</th> <th>多々良川</th> <th>やな川</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>塩分濃度</td> <td>淡水</td> <td>汽水</td> <td>淡水</td> <td>淡水</td> <td>淡水</td> <td>淡水</td> <td>汽水</td> <td>淡水</td> </tr> <tr> <td>殻数</td> <td>15396</td> <td>1747</td> <td>2168</td> <td>536</td> <td>3079</td> <td>4109</td> <td>1105</td> <td>1634</td> </tr> <tr> <td>属</td> <td>15</td> <td>17</td> <td>17</td> <td>21</td> <td>12</td> <td>11</td> <td>31</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>種</td> <td>46</td> <td>44</td> <td>85</td> <td>56</td> <td>41</td> <td>21</td> <td>104</td> <td>44</td> </tr> <tr> <td>DAIpo</td> <td>67.4</td> <td>47.4</td> <td>70.8</td> <td>70.8</td> <td>63.7</td> <td>83.8</td> <td>72.1</td> <td>84</td> </tr> <tr> <td>水質</td> <td>α-貧腐水性</td> <td>β-中腐水性</td> <td>β-貧腐水性</td> <td>β-貧腐水性</td> <td>α-貧腐水性</td> <td>β-貧腐水性</td> <td>β-貧腐水性</td> <td>β-貧腐水性</td> </tr> </tbody> </table> <p>珪藻種の同定の際、目視による同定操作を行ったところ、環境条件の影響により珪藻被殻の変形を確認した。このことから、誤同定の可能性が挙げられ、定量的かつ再現性のある同定法が必要であると考え、分子生物学的手法を用いた珪藻の多様性の解析に注目した。分子生物学的手法を用いた珪藻の多様性の解析については第 3 章にて述べる。</p> <p>第 3 章では、PCR-DGGE (ポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法を用いて、おとめが池および博多川の珪藻の多様性を解析した結果について述べた。PCR-DGGE 法は、PCR を基本とした解析方法で、ヒトの腸内細菌や深海の熱水噴出孔周辺など、様々な環境中の微生物群集の多様性に関する解析に利用されている。おとめが池および博多川からそれぞれ DNA を精製し、従来法 (Rebecca et al. (2004))および新法 (堺法) の PCR 条件で増幅後、DGGE による DNA の分離を試みた結果、堺法では 4~7 の珪藻由来 DNA 断片を分離できたが、従来法では分離する事ができなかった。このこと</p>	採取地点	おとめが池	博多川	宝満川	小田川	室見川	高尾川	多々良川	やな川	塩分濃度	淡水	汽水	淡水	淡水	淡水	淡水	汽水	淡水	殻数	15396	1747	2168	536	3079	4109	1105	1634	属	15	17	17	21	12	11	31	17	種	46	44	85	56	41	21	104	44	DAIpo	67.4	47.4	70.8	70.8	63.7	83.8	72.1	84	水質	α-貧腐水性	β-中腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性	α-貧腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性
採取地点	おとめが池	博多川	宝満川	小田川	室見川	高尾川	多々良川	やな川																																																								
塩分濃度	淡水	汽水	淡水	淡水	淡水	淡水	汽水	淡水																																																								
殻数	15396	1747	2168	536	3079	4109	1105	1634																																																								
属	15	17	17	21	12	11	31	17																																																								
種	46	44	85	56	41	21	104	44																																																								
DAIpo	67.4	47.4	70.8	70.8	63.7	83.8	72.1	84																																																								
水質	α-貧腐水性	β-中腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性	α-貧腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性	β-貧腐水性																																																								

	<p>から、堺法のほうが従来法より DNA の分離が良かったことが分かった。堺法の PCR-DGGE 解析を用いた珪藻由来 DNA 断片数は、顕微鏡観察による同定数と比較して明らかに少なかった。分離された DNA 断片をシーケンス解析したところ、目視での優占種がすべて検出されるわけではなく、また今回の PCR-DGGE 法ではサンプル中すべての種を特定できない可能性が示唆された。</p> <p>第4章では、Silaffin とよばれるケイ酸と親和性を持つ珪藻タンパク質の大量発現系の構築と、大腸菌から精製した組換え体 Silaffin を用いたバイオシリカの生産について述べた。バイオミネラリゼーションは広範な現象であるが、これらの分子メカニズムは未だに解明されていない。珪藻はシリカでできた細胞壁をもっているため、このような構造の例として有名である。最も興味深いことは、珪藻のバイオシリカには、種特異的にマイクロメートルからナノメートル程度の多彩な構造パターンを持つところである。</p> <p>Silaffin の一部分である silaffin-1A1(Sil-1A1)ペプチドをコードする、人工的に合成された遺伝子の大量発現系を構築した。pPEPTIDE ベクターにより、組換え Sil-1A1 は poly(His)-Tag を含む高発現融合タンパク質と融合した形で発現する。組換えタンパク質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて解析を行った。最後に、大腸菌から組換えタンパク質を精製し、球状で微小のバイオシリカを合成することができた。</p> <p>第5章では、本論文の主要な結果を要約している。</p>
<p>論文内容の要旨 (英文)</p>	<p>In the first chapter, background information and the objectives of this study are presented through a description of published research on the use of diatoms to evaluate water quality, as well as the potential applications of biosilica.</p> <p>In the second chapter, I describe the use of DAIPo (diatom assemblage index to organic water pollution) values to evaluate water quality in several rivers and ponds. The epilithic diatoms that are present in riverbed microbial communities have been classified as saprophilous and saproxenous, in addition to several undifferentiated groups of taxa, based on statistical analyses of their tolerance to organic water pollution. The sampling sites used for this analysis include Otomegaike pond, Hakata River, Houman River, Kota River, Muromi River, Takao River, Tatara River, and Yana River in Fukuoka Prefecture, Japan. The results, which include the calculated DAIPo values and an evaluation of water quality levels, are described in this chapter.</p> <p>In the third chapter, the diversity of diatoms in Otomegaike pond and the Hakata River are evaluated using the PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) method. A total of 4 and 7 diatom taxa are identified from Otomegaike pond and Hakata River, respectively, using purified DNA for PCR-DGGE analysis. The number of diatom taxa identified using PCR-DGGE analysis was considerably less compared to the number identified by microscopic observation. This result may indicate that PCR-DGGE cannot separate the amplified DNA (a partial 18S rRNA gene) of related species.</p> <p>In the fourth chapter, the biological formation of inorganic materials that have complex structures of biominerals is a widespread phenomenon in nature, yet the molecular mechanisms underlying biomineral morphogenesis remain poorly understood. Diatoms are well-known examples of such structures, due to the possession of a cell wall composed of silica. I constructed an overexpression system for the synthetic gene encoding silaffin-1A1 peptide (Sil-1A1), which is a part of silaffin-1. The recombinant protein was analyzed using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, biosilica spheres were produced using the recombinant protein purified from <i>E. coli</i>.</p> <p>The final chapter summarizes the main results of this study.</p>
<p>論文審査結果</p>	<p>この論文は、細胞の周りに珪酸質の被殻をもつことから珪藻とよばれている単細胞性</p>

藻類に関して、池や河川の珪藻群集の解析を行うことによって水質評価を行うとともに、その遺伝子解析技術の珪藻群集解析ならびにバイオミネラリゼーションへの応用についてまとめたものである。

第1章では、珪藻の生物学的特徴と水質評価やバイオミネラリゼーションへの応用に関する本研究の背景とその目的について述べている。第2章では、福岡県内の一つの池と七つの河川について、顕微鏡による被殻の形態観察によって群集解析を行い、珪藻種の水質適応性と出現頻度に基づく生物判定法 (DAIpo 法) により水質評価を行っている。これまで福岡県内の河川について同法で評価した例はほとんどなく、また汽水域の評価に適用した初めての例といえる。第3章では、最近、様々な環境中の微生物群集の多様性解析法として注目されている PCR-DGGE (ポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法に着目し、珪藻の群集解析への応用を試みている。その結果、前章で採取した池と一つの河川の珪藻から DNA を精製し、すでに報告されているプライマーを用いた PCR によって増幅した場合には DGGE による DNA 断片の分離が確認できないのに対し、独自に設計したプライマーを用いた場合には 4~7 種の DNA 断片に分離できることを明示している。同法を珪藻由来の DNA 解析に応用した研究としては、これまで海洋性珪藻の同定に関する報告例があるのみで、淡水性珪藻の多様性解析に応用したのは本研究がはじめての例であり、珪藻の新しい群集解析法としての可能性を示すものとして期待される。第4章では、Silaffin とよばれる珪酸と親和性をもつ珪藻タンパク質の大量発現系の構築を目的に、その遺伝子の一部である sil-1A1 遺伝子の塩基配列を大腸菌で使用頻度の高いコドンに置換した配列をもつ人工 DNA を設計し、pPEPTIDE ベクターに組み込むことにより、高発現タンパク質と融合した形で発現させるという新しい組換えタンパク質の発現法を提案している。結果として精製した組換えタンパク質により、球状で微小なバイオシリカが合成されることが見出されており、大量発現法としての有用性が示唆されている。第5章で

以上の研究成果は、査読付き論文 2 編 (第 1 著者 2 編)、紀要等 2 編 (第 1 著者 1 編)、国際会議 1 件、学会発表 (国内) 12 件として公表されている。

以上より、学位論文審査委員会は、この論文が学位論文として適切な内容であると判断した。

学位論文公聴会は 2013 年 2 月 22 日 16 時 30 分より約 20 名の参加者のもとで開催された。公聴会においては、副査を含む参加者から論文内容に関連する種々の工学的及び技術的な質問が 10 数件あったが、いずれも適切な回答を行うことができた。

予備審査ならびに最終試験においては、学位論文に関連する分野の学識を有し、今後研究を進めていくための研究能力を備えていることを確認した。また第 1 著者として査読付き論文を執筆し、国際会議で口頭発表をおこなっていることから、英語論文作成能力も十分に備えていると判断した。

以上の結果から、学位審査委員会はこの論文が博士 (工学) の学位に適格であると判断した。

主な研究業績

参考論文 4 編 1 冊  
(査読付論文)

- 「Evaluation of the water quality of the Hakata River based on diatoms」  
Journal of Environmental Sciences(JES), Vol.25(2013), Issue 6, as the special issue, by Elsevier. (掲載決定) Authors: Masami Sakai, Mitsuyasu Kawakami, Kei Amada
- 「高尾川(福岡県)の珪藻」、Diatoms, Vol. 25, pp. 111-115(2009) 著者: 堺 眞砂美, 天田 啓

(紀要)

- 「おとめが池の珪藻」福岡工業大学環境科学研究所所報、第 6 巻、別冊、pp101-108(2012) 著者: 堺 眞砂美、川上 満泰、天田 啓

4. 「大腸菌による珪藻ペプチドをコードする合成 DNA の大量発現系の構築(2)」、福岡工業大学エレクトロニクス研究所所報、27 巻、65 号、pp. 55 - 58 (2010) 著者：別府 弓生、堺 眞砂美、天田 啓

(国際会議)

5. The 5th International symposium on Environmental Economy and Technology (ISEET-2012), 2-4 August 2012, Fukuoka Institute of Technology, Fukuoka, Japan Oral Sessions(O-A9, Paper ID No. 056) 「Evaluation of the water quality of the Hakata River based on diatoms」 Presenter: Masami Sakai, Mitsuyasu Kawakami, Kei Amada

(学会発表・国内)

6. 堺 眞砂美・川上満泰・天田 啓：「福岡県やな川の珪藻」日本珪藻学会第 30 回研究集会(口頭発表)(2010.11 福岡)

7. 2) 堺 眞砂美・川上 満泰・天田 啓：「おとめが池の珪藻」福岡工業大学 環境研究所 環境研発表 2012(口頭発表)(2012.3 福岡)

8. 3) 堺 眞砂美・川上 満泰・天田 啓：「福岡県汽水域の珪藻」日本珪藻学会第 32 回研究集会(ポスター発表)(2012.11 広島)

9. 1) 堺 眞砂美・天田 啓：「珪藻を用いた水質調査」第 45 回化学関連支部合同九州大会(ポスター発表)(2008.7 北九州)

10. 2) 堺 眞砂美・天田 啓：「珪藻を用いた水質調査」第 46 回化学関連支部合同九州大会(ポスター発表)(2009.7 北九州)

11. 3) 堺 眞砂美・川上 満泰・天田 啓：「珪藻を用いた水質調査」第 47 回化学関連支部合同九州大会(ポスター発表)(2010.7 北九州)

12. 4) 堺 眞砂美・川上満泰・天田 啓：「PCR-DGGE 電気泳動法を用いた珪藻の群集解析」第 17 回日本生物工学会九州支部沖縄大会(口頭発表)(2010.12 沖縄)

13. 5) 堺 眞砂美・川上 満泰・天田 啓：「珪藻の同定による多々良川の水質調査」第 48 回化学関連支部合同九州大会(ポスター発表)(2011.7 北九州)

14. 6) 堺 眞砂美・川上満泰・天田 啓：「PCR-DGGE 電気泳動法を用いた珪藻の群集解析」第 18 回日本生物工学会九州支部福岡大会(口頭発表)(2011.12 福岡)

15. 7) 堺 眞砂美・木下 智友美・川上 満泰・天田 啓：「小田川の水質調査」第 49 回化学関連支部合同九州大会(ポスター発表)(2012.7 北九州)

16. 8) 堺 眞砂美・川上満泰・天田 啓：「PCR-DGGE 電気泳動法を用いた珪藻の群集解析」第 19 回日本生物工学会九州支部大分大会(口頭発表)(2012.12 大分)