【327】

氏　名（本籍）	渡　邊　圭　司（茨 城 県） わた　なべ　けい　じ
学 位 の 種 類	博　　士（農　　学）
学 位 記 番 号	博　乙　第　2142　号
学位授与年月日	平成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**微細藻類 *Chlorella* を中心とした微生物複合系の共生メカニズムの解析**

主　査	筑波大学教授	工学博士	田　中　秀　夫
副　査	筑波大学教授	農学博士	内　山　裕　夫
副　査	筑波大学教授	工学博士	向　高　祐　邦
副　査	筑波大学助教授	農学博士	青　柳　秀　紀

論 文 の 内 容 の 要 旨

21 世紀の微生物産業において微生物資源を有効に活用する方法として，微生物複合系の利用が注目されている。難分解性物質の分解などにおいては，単独の微生物よりも微生物複合系の方がその分解に重要な役割を果たしていると報告されている。微生物複合系そのものを自然界から取り出し，微生物間の共生メカニズムを明らかにすることは，微生物複合系を微生物産業に活用するために重要である。

自然界の微生物複合系のモデルとして，*Chlorella sorokiniana* IAM C-212 と雑菌のコンタミネーションの系に注目した。このクロレラ株は，雑菌が混入したまま分譲された株であり，それらの相互の結びつきが非常に強いために純粋化されていない状態であった。また，雑菌はクロレラの生育を阻害することは一切無く，クロレラと生育を共にしていたことから，両者は共生関係にあると推定された。この株から雑菌（共生微生物）の分離を試みたところ，4 種のバクテリア（CSSB-1, CSSB-2, CSSB-3, CSSB-4 と命名）と 1 種のカビ（CSSF-1 と命名）が混入していることを確認した。バクテリアのうち CSSB-4 は，初代培養株のみがコロニー形成能を有しており，継代培養することができなかった。また，種々の抗生物質を添加することにより，クロレラの純粋株を作製することに成功した。この純粋化した株を用い，クロレラと共生微生物の共生メカニズムの解析を行った。クロレラは光合成により菌体外に有機物（EOC = Extracellular released Organic Carbon）を排出しており，共生微生物はこの EOC を栄養源として生育していた。EOC の構成成分について調べたところ，糖，アミノ酸，ビタミンなどから構成されていた。EOC 成分は，各共生微生物により特徴的な消費パターンを示し，この消費データを基に人工の EOC 培地を作成した。人工 EOC 培地でそれぞれの共生微生物を生育させたところ，各共生微生物は天然EOC培地で生育させた場合と同様の生育を示した。以上の結果より，本研究により初めて EOC をモデルとした天然の栄養状態に近い低栄養源性の人工栄養培地を作製することができた。まを，この培地で微生物をスクリーニングした場合，得られた微生物はクロレラに生理的な害を与えない限り，光独立栄養条件下で人工的にクロレラに共生（片利共生）させておくことができると推定される。抗生物質処理により純粋化したクロレラ株と，共生微生物が混入したままのクロレラ株を混合培養（液体培養）した場合，CSSB-1 と CSSB-2 はクロレラに対し何ら影響を与えていなかったが，CSSB-3 と CSSF-1 をクロレラと混合培養した場合，クロレラに対し増殖促進効果を与えていることが明らかとなった。

以上の結果より，CSSB-1 と CSSB-2 はクロレラが光合成により菌体外に排出した EOC を増殖基質としている片利共生の関係にあること，一方，CSSB-3 と CSSF-1 はクロレラから増殖基質として EOC を受け取りクロレラに対し何らかの増殖促進物質を提供している相利共生の関係にあることが明らかとなった。抗生物質処理により純粋化させたクロレラ株と，共生微生物が混入したままのクロレラ株をスラント（固体培養）により長期間培養した場合，共生微生物が混入したままのクロレラ株は，7 ヶ月という長期間においてもクロロフィルが安定に保持されていたのに対し，純粋化したクロレラ株は 5 ヶ月目あたりから急激なクロロフィルの減少を示した。本研究により，純粋化したクロレラ株よりも共生微生物の混入しているクロレラ株の方が，系として安定しているという興味深い結果が得られた。クロレラと共生微生物の共生形態について調べたところ CSSB-1 と CSSF-1 はクロレラ細胞にダイレクトに付着していた。一方，CSSB-2 と CSSB-3 はクロレラが光合成により菌体外に排出する粒状多糖（sheath）を介して間接的に付着していた。クロレラと CSSF-1 の超音波細胞破砕液には赤血球凝集活性が見られたため，共生微生物とクロレラの細胞同士のダイレクトな付着に関して，レクチン様のタンパク質が関与していることが推定された。本研究により，微生物共生系についての新規な基礎知識が得られた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，微生物複合系の産業への利用を目的とし，自然界の微生物共生系の共生メカニズムの解析を行ったものである。従来の複合微生物系の研究においては，対象とする系の複雑さ故に，実際その複合系で微生物同士がどのような相互関係を築いているのかを特定することが非常に困難であった。このような問題点を踏まえた上で，本研究では，微生物複合系のモデルとして微生物のコンタミネーション現象（微細藻類と雑菌の系）に着目した。本複合系においては，雑菌の生育が微細藻類であるクロレラの EOC に依存するため，この EOC が複合系を形成するための重要な因子となっていた。一方，クロレラは雑菌の内，CSSB-3 株（バクテリア）および CSSF-1 株（カビ）により，混合培養時にクロレラの増殖が促進されることが観察された。また，雑菌の混入したままのクロレラ株と，抗生物質処理により雑菌を除いたクロレラ株を長期間（7 ヶ月間）培養したところ，純粋化したクロレラ株よりも雑菌が混入した株の方が，長期間安定に細胞中のクロロフィル含量が維持されるという興味深い結果が得られた。実際の複合系の形態形成においては，クロレラの排出する細胞外ポリマーおよびレクチン様の糖認識タンパク質が，微生物同士の接着に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究では，シンプルな微生物複合系を研究対象として選択することにより，今までに報告されていない新規な微生物複合系における相互作用（共生メカニズム）を広く明らかにしたという点で，評価できる。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。