

氏名(本籍)	おう しょう し 王 碩 治 (中 国)
学位の種類	博 士 (環 境 学)
学位記番号	博 甲 第 6152 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Interactions between Fungi and Bacteria Associated with Degradation of PAHs (多環芳香族炭化水素 (PAHs) の分解における真菌と細菌の相互作用の解明)

主	査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副	査	筑波大学教授	博士 (農学)	張 振 亜
副	査	筑波大学准教授	博士 (工学)	野 村 暢 彦
副	査	筑波大学准教授	博士 (学術)	中 島 敏 明

論 文 の 内 容 の 要 旨

微生物を用いた環境修復技術であるバイオレメディエーションにおいて、汚染物質分解の主役は“細菌”であることが通説となっている。しかし、実汚染浄化現場の土壌中には、細菌、真菌、藻類、原生動物など様々な生物が存在して微生物群集構造を形成している。近年、真菌が様々な細胞外分泌酵素を分泌して高分子量の汚染物質分解に関わり、その結果、多様な分解経路の存在が徐々に明らかになってきた。その代表的な研究例としてリグニン分解があり、多種のリグニン分解菌が汚染現場に存在し、白色腐朽菌、菌根菌などが難分解性有機化合物の分解菌として報告されている。一方、かさ高く高分子量の有機化合物には一般的に耐熱性、水不溶性及び土壌吸着性であるものが多く、それらに対する細菌の分解効率率は低いため難分解性化合物として認識され、報告されている分解細菌の種類も限定されている。このため本研究では、真菌と細菌の協同作用により高分子有機物質を分解させることに着目し、難分解性化合物である多環芳香族化合物 (PAHs : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) を対象として、細菌と真菌の分解における相互関係の評価を行うこととした。

PAHs として Phenanthrene、Fluoranthene 及び Pyrene を選択し、これらを唯一炭素源としたスクリーニングにより、林地土壌から分解微生物を単離した。単離した株の PAHs 分解能測定及び PCR-RFLP による系統的グルーピングにより、細菌 4 株、真菌 7 株を以降の研究対象株として選抜し、細菌については 16S rRNA gene を、真菌については 28S rRNA gene を解読することによって同定した。

次いで、PAHs による人工汚染砂質土壌を用い、細菌 4 株、真菌 7 株、およびそれら 11 株を混合した 3 種の混合培養系を作成し、それぞれの PAHs 分解能および変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) による菌叢変動を観察した。その結果、細菌群集体、真菌群集体ではそれぞれ 56%、39% の pyrene 分解に対し、11 株群集体では 67% と分解能の促進効果が認められ、細菌 *Pseudomonas* sp. TKB 1、*Ralstonia* sp. TKB 3 及び *Rhodococcus* sp. TKB 4 が分解に伴って増加する一方で、真菌の *Fusarium* sp. TKF 4、*Trichoderma* sp. TKF 7 などは減少する事が観察された。また、真菌と細菌を 1:1 に組み合わせた混合培養を行い分解における相互作用について検討した。真菌 *Fusarium* sp. TKF4、*Penicillium* sp. TKF5 及び *Trichoderma* sp. TKF7 により

1-hydroxypyrene と 1-methoxypyrene が pyrene の主代謝産物として検出されたが、細菌 *Pseudomonas* sp. TKB1、*Labrys* sp. TKB2 が 1-hydroxypyrene をさらに分解することが確認された。さらに分解過程において、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により TKB2 菌細胞が TKF5 の菌糸体に大量付着している事が明らかにされた。

以上により、真菌の分解によって生じる様々な代謝産物が細菌によってさらに分解され、かさ高く分子量の大きな難分解性化合物はまず真菌によって修飾され、次いで細菌によってさらに低分子化されることが示唆された。また、その間には真菌と細菌との接触による相互作用のあることが示唆された。本成果は、今後、汚染現場で有効な修復技術を設計していく上で貴重な知見になるものと期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

バイオレメディエーションの分解能を担うのはこれまで細菌とされてきたが、著者は細菌のみならず真菌にも着目し、真菌の環境汚染化合物に対する分解能の評価と、細菌-真菌間の相互作用の解明に取り組んだ。細菌のみ、あるいは真菌のみでの分解能と比較して、両者を混合した系では更なる分解能の促進があることを見いだした。また、分解代謝産物の分析を行うことでかさ高く難分解性であるピレンをまず真菌が分解し、その分解産物をさらに細菌が低分子化することを示唆する現象を発見した。さらに、細菌と真菌の相互作用について新しい知見を得た。

従来の細菌を主体としたバイオレメディエーションに対し、真菌の存在とその役割に着目した発想は斬新であり、また、真菌と細菌の相互作用について代謝産物の分析を介した解明および SEM を用いた形態観察で得られた知見は、学術的に価値があるのみならず今後のバイオレメディエーションの新たな展開に繋がるものでもあるため、高く評価することが出来る。

平成 24 年 2 月 9 日、学位審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。