

氏名	春間 俊克		
学位の種類	博 士 (農学)		
学位記番号	博 甲 第 8 5 9 3 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 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	内生菌 <i>Chaetomium cupreum</i> が関与する ススキ ( <i>Miscanthus sinensis</i> Andersson) の Al 耐性機構の解明		
主査	筑波大学准教授	博士 (農学)	山路恵子
副査	筑波大学教授	農学博士	田村憲司
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	上條隆志
副査	筑波大学助教	博士 (生物工学)	小川和義

## 論 文 の 要 旨

近年、鉱山跡地では、在来の遷移初期種を利用した緑化が重要とされる。鉱山跡地のような酸性環境において生育できる植物は重金属やAlへの耐性機構を有すると考えられ、そのような耐性機構は内生菌により増強されることが報告されている。本論文は、鉱山跡地に自生するススキ (*Miscanthus sinensis* Andersson) のAl及び重金属耐性機構を、根に生息する内生菌との相互作用を考慮して解明することを目的としている。本目的を達成するため、1) 現地で生育するススキの含有元素濃度の分析、2) 過剰に含まれるAlの解毒に関わる代謝産物の解析、3) 内生菌 *Chaetomium cupreum*が産生するAlの解毒物質の同定を行い、ススキが鉱山跡地で繁茂する要因を化学的側面から検証している。

著者は、ススキの自生する調査地土壌は酸性であり、高濃度の交換性 Al 及び Cu, Pb, Zn が含まれることを明らかにした。酸性土壌では Al や重金属がイオン化し植物が吸収しやすい形態となるが、ススキに含まれる Cu, Pb 及び Zn は低濃度であったことから、ススキは重金属排除機構を有する可能性が示唆された。一方、根の Al 濃度は年間を通して高濃度であったことから、ススキは Al 解毒機構を有すると考えられた。根から citric acid、malic acid、chlorogenic acid 及び *trans*-aconitic acid が検出され、Al 解毒にはこれらの化合物が寄与していると考えられた。

次に著者は、根から分離された内生菌であり、高い siderophore 産生能を有する *C. cupreum* とススキ実生を用いた現地土壌接種試験を行い、*C. cupreum* が関与するススキの Al・重金属耐性機構の解明を試みた。その結果、*C. cupreum* の接種による実生の生長促進が確認された。栄養元素の吸収促進は確認されなかったが、*C. cupreum* には IAA 様化合物の産生能が確認されたことから、本化合物の産生がススキの成長を促進したと推察された。また、接種区・未接種区ともに根の Al 及び Fe は高濃度であり、*C. cupreum* の接種によりこれら元素の吸収促進が確認された。一方、両区において Cu, Pb 及び Zn は比較的低濃度であり、調査地のススキと同様の傾向が確認された。Al や Fe は Cu や Zn と吸収競合するため、ススキでは根に過剰に蓄積した Al や Fe が間接的に Cu や Zn の吸収抑制に寄与していると考えられた。また本試験において、根には chlorogenic

acid、malic acid、citric acid が検出され Al 耐性に寄与していると考えられたが、接種区・未接種区ともに根には高濃度の Al が蓄積されており、これらの化合物による解毒のみでは Al 耐性が説明できなかった。そこで著者は、水耕接種試験を行うことで根における Al 局在を確認した結果、未接種区の根の細胞壁には Al の局在が全体的に観察され、細胞壁隔離によって Al を解毒していることが判明した。*C. cupreum* の接種区では、表皮と内皮の細胞壁及び維管束に Al が局在することが明らかとなり、内皮への Al 蓄積はカスパー線が毒性軽減に機能していると考えられた。接種区では、根周囲の菌糸に Al 蓄積が確認されたことから、*C. cupreum* は Al を菌糸に蓄積することで Al 耐性を増強すると考えられ、本現象には *C. cupreum* の産生する siderophore が関与すると推察された。以上のことから著者は、*C. cupreum* はススキが元来有する Al・重金属耐性機構を増強させたと考えた。

次に著者は、*C. cupreum* が産生する siderophore を精製し、HPLC/MS 及び粉末 X 線回折装置で分析することで oosporein と同定した。pH 滴定法によって oosporein と Al の錯安定度定数は 12.1 と算出され、ススキが産生する chlorogenic acid (錯安定度定数：15.06) と比較して低いものの、malic acid (5.4)、citric acid (8.0) より高い値であることが明らかとなった。*C. cupreum* は機能的な oosporein を産生し、ススキの Al 耐性を増強していると考えられた。

以上の結果から、著者は、内生菌 *C. cupreum* がススキ根における Al の局在部位を変化させ、菌糸への蓄積による Al 解毒の効率化、機能的な oosporein の産生による Al の解毒を行うことで、ススキの Al 耐性機構を増強すると結論した。また著者は、*C. cupreum* 感染によって高濃度に蓄積された Al や Fe は Cu や Zn の吸収を抑制し重金属耐性機構に寄与すると推察し、*C. cupreum* による Al 及び重金属耐性機構の増強は、ススキが鉱山跡地で繁茂できる一因であると結論した。

## 審 査 の 要 旨

著者は、鉱山跡地で自生するススキにおける Al 及び重金属耐性機構を、内生菌の関与を含め明らかにした。まず、現地のススキの含有元素濃度を通年に渡り精査し、ススキは根に高濃度の Al を含有するが、Cu、Pb 及び Zn 濃度は低いことを明らかにした。次に、ススキ根から分離された内生菌で高い siderophore 産生能を有する *C. cupreum* とススキ実生を用いた接種試験を行った結果、*C. cupreum* は IAA 様化合物を産生し生長を促進させ、根における Al の局在部位を変化させることで効率的な解毒効果を付与し、菌糸への蓄積や機能的な oosporein の産生による Al の解毒を行うことで、元来有するススキの Al 耐性機構を増強すると考えられた。また、*C. cupreum* 感染によって高濃度に蓄積された Al や Fe は Cu や Zn の吸収を抑制し、重金属耐性に寄与すると推察された。以上の結果は、植生回復が必要とされる鉱山跡地において、植物-微生物共生系を応用した緑化を考慮する上で、環境化学分野において重要な基礎的知見を提供するものと判断され、高く評価できる。

平成 30 年 1 月 23 日、学位論文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（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。