

審査の結果の要旨

氏名 許振興

本論文は水田土壌の還元的窒素変換を担う鉄還元細菌の分離と性状解析について述べたもので5章より成る。

第1章では本研究の背景と目的について述べている。水田土壌においては湛水期間中、様々な還元反応が起きる。中でも脱窒、アンモニウム生成型異化的硝酸還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA)、窒素固定等の還元的窒素変換反応は、アンモニウムの生成・保持や、土壌からの硝酸の溶脱、一酸化二窒素(N₂O)排出の低減に貢献する反応であり、持続的な水稲生産と環境保全を支えている。申請者が所属する土壌圏科学研究室では、還元的窒素変換反応を駆動する微生物を、水田土壌由来のRNAを用いたメタトランスクリプトーム解析により特定している。その結果、還元的窒素変換反応に関連する遺伝子転写産物の多くは、鉄還元細菌として知られる *Deltaproteobacteria* 綱の *Geobacter* および *Anaeromyxobacter* 属に由来することが明らかにされていた。しかしこれらの鉄還元細菌は、これまで水田土壌から分離されておらず、窒素変換機能も確認されていなかった。本研究では、水田土壌からこれら鉄還元細菌を分離し、生物地球化学的物質変換、特に窒素変換に関わる機能を探ることを目的としている。

第2章では *Geobacter* 属および *Anaeromyxobacter* 属細菌の単離・同定と *Geobacteraceae* 科細菌の再分類について述べている。水田土壌から鉄還元細菌を分離するため日本全国から水田土壌や底質を採取し、嫌気条件下で集積培養を行い、*Geobacter* 様菌株を63株、ならびに *Anaeromyxobacter* 様菌株を3株分離した。多相分類学的解析の結果、*Geobacter* 様分離株から14の新種、2つの新属を提唱し、*Geomonas* および *Oryzomonas* と命名した。さらに *Geobacteraceae* 科は再分類が必要であることも示し、新たに11属の Clade に分割することを提案している。

第3章では *Geomonas* 属および *Oryzomonas* 属細菌が好む生息環境と生物地球化学的な役割について述べている。新種の *Geomonas* 属および *Oryzomonas* 属細菌は、水田土壌が主な生息環境であることが示された。公共データベースのメタゲノム解析から、水田土壌における窒素変換に *Geomonas* 属が大きく関与していることが示唆された。本研究で分離し

たこれら細菌の菌株は全て鉄還元能を示した。またアセチレン還元活性試験から、窒素固定能も確認された。窒素固定活性は Fe(III)-NTA により高められ、硝酸塩と亜硝酸塩により阻害された。さらにこれらの菌株は、炭素源として酢酸の他、稲わらの主要構成成分であるセルロースやキシランを利用して窒素固定を行った。このことから、これらの菌株は水田土壌において稲わらから炭素源を得て窒素固定を行い、土壌の炭素および窒素循環の両者に関わっている可能性が示された。

第 4 章では *Geomonas* 属細菌の DNRA 活性および DNRA 由来の N_2O 生成経路について述べている。*Geomonas* 属の菌株は DNRA 活性を有し、その過程で N_2O を生成した。DNRA を通した N_2O 生成についてはほとんど報告が無いため、2 種の *Geomonas* 株を用いて生理的試験を行った。その結果、 N_2O は生物的反応により主に亜硝酸から生成されることが示された。定量解析から、DNRA の生成物としては NH_4^+ が大部分で N_2O は少量であり、*Geomonas* 属細菌は DNRA によって水田土壌の窒素肥沃度維持に貢献していることが示唆された。DNRA 由来の N_2O の窒素原子の site preference (SP) 値は他の窒素変換反応由来の N_2O の SP 値よりも著しく高いことを見出し、SP 値は N_2O 生成経路の特定に利用できることが示された。また、硝酸還元酵素(Nar)遺伝子群の発現解析等から、*nar* 遺伝子群が *Geomonas* 属細菌の N_2O 生成に関わる重要な酵素遺伝子群であると考えられた。一方、培地の pH や C/N 比が NO_2^- の蓄積を介して N_2O 生成に影響を与えることも示され、土壌からの N_2O 排出抑制に応用できる知見が得られた。

第 5 章では本研究の総括と展望を述べている。本研究では、日本の水田土壌から多数の鉄還元細菌を分離し、新種と新属を提唱している。同時に、*Geobacteraceae* 科を再分類した。鉄還元、窒素固定、稲わら構成成分の炭素源としての利用、DNRA 能を確認し、*Geomonas* 属および *Oryzomonas* 属細菌が水田土壌におけるアンモニウム生成に貢献していることを示した。*Geomonas* 属細菌が行う DNRA 反応の副産物である N_2O が主に亜硝酸から生成されることを明らかにし、 N_2O 排出抑制に繋がる知見を得た。本研究は、鉄還元細菌が水田土壌における還元的窒素変換、特にアンモニウム生成に重要な役割を果たしていることを明らかにし、持続的な水稻生産に大きく貢献している可能性を示したものである。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。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。