

## 審査の結果の要旨

氏名 増田 曜子

湛水下の水田土壌では嫌気的な環境が発達し、窒素循環に関わる各種の還元反応（脱窒、硝酸のアンモニアへの異化的還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia, DNRA)、窒素固定）が活発に起こる。このことが、畑土壌では見られない「硝酸の低溶脱」「窒素肥沃度の維持」といった水田土壌の環境保全性ならびに持続的生産性の基柱となっている。これらの反応を駆動する微生物群を明らかにするために、これまで PCR ベースの解析手法が多用されてきた。しかし、PCR ベースの手法ではプライマーのミスマッチにより多様性を著しく過少評価してしまう危険性がある。本研究では、この問題を回避し網羅的な解析を行うため、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を行った。

第1章において研究の背景と目的を述べた。

第2章では、湛水直後から収穫後にかけての5つの時期に採取した土壌を用いて理化学性の調査と、抽出した土壌 RNA を用いたメタトランスクリプトーム解析を行った。rRNA 配列情報に基づく細菌群集構造解析では、最も還元環境となる湛水期の下層土壌において *Deltaproteobacteria* 綱の嫌気性鉄還元菌である *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌が優占していることが明らかになった。一方、窒素循環反応に関わる微生物群集構造解析は全てのサンプルをまとめて行った。亜硝酸還元反応以外の全ての脱窒反応、DNRA 反応、窒素固定反応において、既知の脱窒細菌、DNRA 細菌、窒素固定細菌とは異なる *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の mRNA が高頻度に検出された。

第3章では、第2章において見出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌の還元的窒素循環反応への関与を詳細に検証するために、湛水期、落水期の表層、下層土壌を解析対象とし、メタゲノム解析とともにシーケンス量を増やしたメタトランスクリプトーム解析を行った。脱窒反応の各ステップを触媒する酵素遺伝子 (*nir*、*nor*、*nos*) とその転写産物を調べたところ、*nir* は従来の脱窒菌(*Alpha*-、*Beta*-、*Gammaproteobacteria* 綱細菌)由来のものが検出された一方、*nor* や *nos* はこれまでにほとんど検出例がない *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌由来のものが高頻度に検出された。これらのことから水田土壌における脱窒反応は、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が部分的に関与し「協奏的に」進行することがはじめて示唆された。DNRA の鍵酵素遺伝子とその転写産物についても、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌由来のものが高頻度に検出された。さらに驚くべきことに、古くから水田の主要な窒素固定細菌として考えられてきた光合成

細菌の窒素固定遺伝子よりも、これまでほとんど検出例のない *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌の窒素固定遺伝子の方がはるかに高頻度に転写されていることが明らかとなった。これらのことから *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が水田土壌の窒素肥沃度の維持に寄与していることがはじめて示唆された。

第 4 章では、水田を含む様々な環境の土壌を解析対象とし、第 2 章・第 3 章によって得られた新知見の一般性を確認した。土壌サンプルとして、日本全国の 4 カ所の水田土壌、4 カ所の畑・雑草地・森林土壌、4 カ所の底泥を用いた。まず、土壌中の *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌の 16 rRNA 遺伝子量を定量 PCR 法により調べた。また、各土壌 DNA を用いたメタゲノム解析を行った。定量 PCR の結果から、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌は畑・雑草地・森林土壌よりも水田土壌や底泥において優占度が高いことが明らかになった。メタゲノム解析の結果から、脱窒、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の検出頻度は、水田が最も高く、続いて底泥、畑・雑草地・森林土壌であった。また、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の群集構造については、畑・雑草地・森林土壌と比較して水田土壌や底泥において *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌の優占度が高かった。これらのことから、還元的窒素循環反応は水田土壌においてポテンシャルが高く、新潟水田以外の水田土壌や底泥においても、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌がこれらの反応のキープレイヤーである可能性が示された。

第 5 章では、本研究によって示された「鉄還元菌が主導する還元的窒素変換反応」についての新知見はこれまでの PCR ベースの手法において何故見落とされてきたのかについて考察し、これら鉄還元菌の窒素固定遺伝子は他の細菌由来の遺伝子に比べて GC 含量が高く、PCR 増幅されにくいことが理由であると述べた。なお、*Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌はほとんどの還元的窒素循環反応において活性を保有することが報告されており、実際に土壌中の還元的窒素循環反応を駆動している可能性が高い。

以上、本研究は水田土壌の窒素循環を駆動する微生物群集構造に関する知見を大きく刷新し、生態系において *Deltaproteobacteria* 綱の鉄還元菌が水田土壌の硝酸溶脱の低減や窒素肥沃度の維持に大きく寄与していることを明らかにしたものである。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。