



Title	北方圏における亜酸化窒素消去微生物の探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高津, 祐太
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第14818号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/85522
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Takatsu_Yuta_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学) 氏名 高津祐太

審査担当者	主査	教授	橋本	誠
	副査	教授	松浦	英幸
	副査	講師	崎浜	靖子
	副査	講師	宮本	敏澄

学位論文題名

北方圏における亜酸化窒素消去微生物の探索

本論文は93頁、表16、図45、7章からなり、参考論文3編が付されている。

亜酸化窒素(N_2O)は、温室効果ガスとして知られており、二酸化炭素と比較すると約300倍もの21世紀最大のオゾン層破壊原因物質とされる気体である。食糧生産に必要な圃場からは全世界における N_2O 放出量の約7割を占め、これは大量の化成窒素肥料の施肥によるものとされている。土壤中に蓄積した過剰な NO_3^- は、降雨後に出現する一時的な嫌気性条件下で脱窒細菌群による硝酸塩呼吸により電子受容体として還元を受け、 N_2O が大気中に放出されると推測されている。この状況を実験室的な手法で再現するため、ガスクロバーカル中での土壤培養により1週目で N_2O が生じ、2週目で N_2O がほぼ消去される現象がしばしば確認された。この現象を土壤中に N_2O を消去する微生物群の存在を示唆するものとして研究を行った。

申請者は、北方圏土壤として北海道大学附属静内牧場内のデントコーン圃場黒ボク土およびフィンランド・パルサ丘陵地から N_2O 消去能を有する土壤細菌の探索を試み、その挙動解明を目指し様々な実験を行うことで以下の知見を得た。

1. 北海道大学附属静内牧場からの強力な亜酸化窒素消去微生物の分離および挙動評価

2016年4月下旬に北海道大学附属静内牧場の圃場から採取した土壤を、4°Cで保存し、保存における経時変化を確かめたところ、採取直後と4年保存においては大きな差は見られなかった。10 mg 土壤を10 ml 蒸留水に懸濁し、懸濁液上清100 μLを N_2O 生成アッセイ用ゲランガム培地に接種後、密封し7~14日間培養した。 N_2O 消去能を示す細菌のスクリーニングを行うため、ヘッドスペースガスをガスクロマトグラフィー分析にかけ、経時に N_2O 量の変動をモニタリングした。幾つかの培養物では初期に高濃度の N_2O が生成蓄積するものの、2週間目以降、急激な N_2O 濃度の低下が認めら、亜酸化窒素消去能をもつ微生物の可能性が示された。これらの培養物から単コロニー分離を試み各分離コロニーについて N_2O 消去能の有無を検定した。その結果、 N_2O 消去細菌を1株見出だす(Sac-f1株)ことに成功し、これを16S rRNA遺伝子配列から*Chitinophaga* sp. Sac-f1株と同定した。 N_2O 消去の至適培養条件を検討した。窒素源としてアミノ酸類の効果を検討したところアスパラギン酸を添加すると N_2O

消去能の up regulate が観察された。さらに N₂O 放出が確認されている静内牧場デントコーン畑地土壤 5 mg を接種源とした Sac-f1 株同時接種したソフトゲル培地処理区あるいは土壤そのものに Sac-f1 株を直接接種した処理区について、N₂O 放出抑制を検定し、Sac-f1 株が土壤からの N₂O 放出を抑制することができる可能性を示すことに成功した。

2. Chitinophaga sp. Sac-f1 株の亜酸化窒素消去能の検証

Sac-f1 株を詳細に調べたところ、通常 N₂O 消去経路としてよく知られている N₂O から N₂ への脱窒反応に関連するとされている遺伝子 nosZ 遺伝子を持っていなかった。また Sac-f1 株は NO₃⁻ や NH₄⁺ からの N₂O 放出能も示さないことが明らかとなった。しかしながら脱窒による消去が行われているかを判定することにも用いられるアセチレン阻害法により、Chitinophaga sp. Sac-f1 株の N₂O 消去能は阻害されていることから、この現象を Sac-f1 株が既存の typical-nosZ 遺伝子ではなく、Atypical-nosZ 遺伝子を保持しているものと結論した。これまで Chitinophaga 属では nosZ 遺伝子を保持している報告はされておらず、本研究により Chitinophaga 属が nosZ 遺伝子を保持していることが明らかになった。

詳細な検討の結果、Chitinophaga sp. Sac-f1 株は塩基性条件 (pH. 8.5) で亜酸化窒素消去能に関し最大活性を示すが、様々な pH によっても消去能に大きな影響を与えないものと推察され、黒ボク土壤を用いた実験においても十分に N₂O 放出を抑制したことから、圃場においても N₂O の放出を抑制できる新規な N₂O 消去資材としての利用が期待される結果を得た。

3. フィンランド・パルサ丘陵地における亜酸化窒素消去微生物の探索

地球温暖化の影響で亜北極のミズゴケ泥炭地に発達するフィンランド国キルビスヤルビ周辺に見られていたパルサ氷核コアが融解し始めていることが確認され、地下の氷核によって形成された泥炭層の隆起形状であるパルサ丘陵が沈降に転じている。このような場所では活発的 N₂O 放出が不完全脱窒により起こることが知られている。一般的には N₂O 放出は酸性条件下で起こりやすいとされていることから、pH の影響を詳細に調べた。予想通り pH の上昇と共に N₂O 放出が抑制されることを明らかとした。このことからパルサ崩壊後の泥炭がミネラル豊富な地下水に混合され、pH の上昇によって N₂O が抑制されることを示唆した。しかし、その後の崩壊の前に植生の変化と泥炭の露出のために、N₂O 排出量が増加することも合わせて明らかとした。N₂O 排出量の変動を説明する要因の 1 つとして微生物群集の変化に着目し、塩基性 pH 処理による結果は、パルサ泥炭の微生物群集が広範囲の溶融後の状態に適応するため、窒素循環に予期しない変動を引き起こす可能性を示唆する結果が得られた。これらの結果は、N₂O 還元酵素活性に加えて、細菌群集の変化が N₂O 排出の制御に重要な可能性があることを示した。

以上本研究において、おける亜酸化窒素消去微生物の実験室レベルの結果を実際の土壤に適合するための種々の知見を与えた。よって、審査員一同は、高津祐太が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。