



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14818号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85522
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takatsu_Yuta_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 高津祐太

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

亜酸化窒素 (N_2O)は、等モルあたり二酸化炭素の約 300 倍もの温室効果を示すガスであり、21 世紀最大のオゾン層破壊原因物質ともされる安定な気体である。農地からの N_2O 放出量は全体の約 7 割を占め、圃場への大量の化成窒素肥料の投入が N_2O 放出の主因となっている。蓄積した過剰な NO_3^- は、多くの場合、降雨後に出現する一時的な嫌気条件下で脱窒細菌による硝酸塩呼吸での電子受容体として還元を受け、大量の N_2O が大気中に放出される。ガスクロバイアル中で培養した土壌洗浄後では、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ため、土壌中に N_2O を消去する微生物群が存在するのではないかと推測した。本研究では、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 消去能を有する土壌細菌の探索を試み、その挙動解明を目指した。

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

北海道大学附属静内牧場の圃場から 2016 年 4 月下旬に土壌を採取し、これを 4℃で保存したものを随時使用した。10 mg 土壌を 10 ml Milli-Q 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、7~14 日間培養した。 N_2O 消去能を示す細菌の探索を行うため、ヘッドスペースガス (22.6 mL)をガスクロ分析にかけ、経時的に N_2O 消去量の変動をモニタリングした。幾つかのカルチャー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（計 5 株）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 株見出し (Sac-f1 株)、これを 16S rRNA 遺伝子配列から *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株と同定することに成功した。 N_2O 消去の至適培養条件を検討した結果、窒素源としてアスパラギン酸を添加すると N_2O 消去が大きく亢進した。さらに N_2O 放出が確認されている静内牧場デントコーン畑地土壌 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あるいは土壌そのものに Sac-f1 株を直接接種した処理区について、 N_2O 放出抑制を検定し、土壌からの N_2O 放出を抑制することができる可能性を見いだした。

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

N₂O の消去経路として N₂O から N₂ への脱窒経路が明らかにされているが、この脱窒に関連する遺伝子 *nosZ* 遺伝子をこの Sac-f1 株は有しておらず、また NO₃⁻ や NH₄⁺ からの N₂O 放出能も示さなかった。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が示され、既存の *typical-nosZ* 遺伝子ではなく、*Atypical-nosZ* 遺伝子を保持しているのではないかと考えられる。*Chitinophaga* 属では *nosZ* 遺伝子を保持している報告はなく、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。

また、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は塩基性条件 (pH. 8.5) で最大活性を示すが、黒ボク土壌においても十分に 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、N₂O 消去資材としての利用が期待できる。

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

今日、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、キルピスヤルビ周辺のパルサ氷核コアが融解し始めており、地下の氷核による泥炭層の隆起で形成されているパルサ丘陵が沈降に転じている。このような攪乱地では活発的 N₂O 放出が起こる。一般的に不完全脱窒が関与する N₂O 放出は酸性条件下で起こりやすいとされている。パルサ崩壊後にパルサ泥炭がミネラル豊富な地下水に混合された場合、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、最終的な崩壊の前に植生の変化と泥炭の露出のために、N₂O 排出量が増加したと考えられる。N₂O 排出量の変動を説明する要因の 1 つは、微生物群集の変化である。塩基性 pH 処理のいくつかの異常な結果は、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可能性があり、窒素循環に予期しない変動を引き起こす可能性がある。これらの結果は、N₂O 活性に加えて、細菌群集の変化が N₂O 排出の制御に重要である可能性があることを示した。