



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_review.pdf, 審査の要旨



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壌を、4℃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 土壌を 10 ml 蒸留水に懸濁し、懸濁液上清 100 μ L を N₂O 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。N₂O 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、経時的に N₂O 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 N₂O が生成蓄積するものの、2週間目以降、急激な N₂O 濃度の低下が認められ、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 N₂O 消去能の有無を検定した。その結果、N₂O 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。N₂O 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 N₂O

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処理区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、N₂O 放出抑制を決定し、Sac-f1 株が土壌からの 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、黒ボク土壌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ピ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 排出の制御に重要である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壌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。