

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 劉 冬 艶

論 文 題 目

Dynamics and stability of structure of methanogenic archaeal
community in paddy field soil

(水 田 土 壤 中 の メ タ ン 生 成 古 細 菌 の 群 集 構 造
の 動 的 変 化 と 安 定 性)

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学教授	浅 川	晋
委 員	名古屋大学教授	小 林	哲 夫
委 員	名古屋大学教授	浅 沼	修 一
委 員	名古屋大学准教授	村 瀬	潤
委 員	名古屋大学助教	渡 邊	健 史

メタンは主要な温室効果ガスの一つであり、CO₂の約 25 倍もの高い温室効果活性を持つ。湛水された水田はメタンの重要な発生源であり、放出されるメタンは地球上の全発生量の 5~19%を占める。湛水された水田土壌では絶対嫌気性微生物のメタン生成古細菌によりメタンが作られる。土壌中でのメタン生成機構を理解し、水田からのメタン発生を制御・削減するためには、水田土壌中のメタン生成古細菌の群集構成や存在量およびそれらの動態等を明らかにする必要がある。通常管理が行われている水田ではメタン生成古細菌群集は安定な構造を保っていることが明らかにされているが、水田土壌におけるメタン生成は有機物施用に伴うメタン生成の基質供給と水管理による酸化還元状態の変化により影響を受けることが知られている。すなわち、湛水期間の延長は土壌の還元化を促進し、メタン発生量の増大をもたらす。一方、水田を1年以上の長期間落水することにより土壌は乾燥・酸化条件に晒され、その後の湛水条件下ではメタン放出量が低下する。また、大気中の CO₂濃度を富化した水田では、イネの光合成と生育および根からの有機物の分泌が促進され、結果としてメタン発生量が増加する。しかし、これまでに長期間の湛水あるいは落水処理、および大気中の CO₂濃度富化の処理を行った水田圃場におけるメタン生成古細菌の群集構造については明らかにされてこなかった。そこで、本研究では、これらの水管理および大気 CO₂濃度処理に対して、土壌中のメタン生成古細菌群集がどのように反応し、その菌群構成と存在量がどのような動態を示すかを圃場条件下で分子生態学的手法を用いて解析した。

1) 有機栽培が行われている黒ボク土水田において、冬期湛水がメタン生成古細菌の群集構成に及ぼす影響を、メタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子および methyl-coenzyme M reductase α subunit をコードする *mcrA* 遺伝子を対象にした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法と real-time 定量 PCR 法により解析した。冬期湛水・有機栽培、冬期非湛水・有機栽培および冬期非湛水・慣行栽培が行われている試験水田の各圃場より土壌試料を2年間にわたり採取し解析に供した。メタン生成古細菌の群集構成は冬期湛水・有機栽培の処理や土壌試料の採取時期に関わらず、いずれの圃場でもほぼ同一であると考えられた。各処理圃場で23のDGGEバンドが認められ、4、13、6の配列がそれぞれ *Methanomicrobiales*、*Methanosarcinales*、*Methanocellales* に近縁であった。定量 PCR 解析の結果、圃場間でメタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子数および *mcrA* 遺伝子数に有意な差は認められなかった。以上より、メタン生成古細菌群集は有機栽培下の冬期湛水により影響を受けないことが明らかになった。

2) 大気 CO₂濃度の増加処理 (対照と比べ 200 ppm 富化) が土壌中のメタン生成古細菌の群集構成に及ぼす影響を、メタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子および *mcrA* 遺伝子を対象にした PCR-DGGE 法と real-time 定量 PCR 法により、開放系大気 CO₂

増加 (Free-Air CO₂ Enrichment [FACE]) 試験水田圃場において解析した。水稻移植後 41 日および 92 日目の 2 つの水稻生育時期に、表層部 (深さ 0~1cm) および次表層部 (1~10cm) の作土層の土壤試料を採取し解析に供した。メタン生成古細菌の群集構成は CO₂ 増加処理によりほとんど影響を受けなかったが、群集の存在量は次表層部の土壤では採取時期によりわずかに変動した。一方、particulate methane monooxygenase α subunit をコードする *pmoA* 遺伝子を対象にした定量 PCR 法により求めたメタン酸化細菌の存在量は CO₂ 増加処理により減少した。以上より、大気 CO₂ 濃度富化はメタン生成古細菌の群集構造に影響を及ぼさないが、メタン酸化細菌の群集構造には影響を及ぼすこと、また、このメタン酸化細菌への影響が FACE 水田圃場におけるメタン発生の増加と関連がある可能性を明らかにした。

3) 湛水下の水稻作と落水畑条件下のダイズ作を様々な間隔で行っている田畑輪換圃場において、メタン生成古細菌の群集構造を 16S rRNA 遺伝子および *mcrA* 遺伝子を対象にした PCR-DGGE 法と real-time 定量 PCR 法を用いて解析した。湛水あるいはダイズ播種前、作物の栽培中および収穫後に土壤試料を採取し解析に供した。輪換区では対照の水稻連作区に比べメタン生成古細菌の存在量は約 1 桁低く、メタン生成古細菌の群集構成が異なった。水稻連作区、輪換区ともに *Methanosarcinales*、*Methanocellales*、*Methanomicrobiales*、*Methanobacteriales* のメタン生成古細菌が土壤固有の菌群として認められたが、輪換区ではそれらのうちのいくつかの種類が影響を受け、特に *Methanosarcinales* に属する菌群は輪換により極めて大きな影響を受け存在比率が減少した。以上より、田畑輪換における 1 年以上の畑転換はメタン生成古細菌の群集構造に影響を及ぼし、一部の菌群には極めて重大な影響を与えることが明らかとなった。

4) 水稻作と畑ダイズ作を 2~3 年間隔で行っている田畑輪換圃場において、活性を有するメタン生成古細菌群集の動態を、16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子およびそれらの転写産物を対象にした PCR-DGGE 法、T-RFLP 法および real-time 定量 PCR 法を用いて解析した。3 年間にわたり、湛水あるいはダイズ播種前、作物の栽培中および収穫後に土壤試料を採取し解析に供した。メタン生成古細菌の群集構成と転写活性は田畑輪換により影響を受け、輪換区では水田作あるいは畑作に伴う土壤条件の違いに対応して活性を有するメタン生成古細菌の存在量は変動した。輪換区では 1 年以上の畑転換により *mcrA* 遺伝子の転写産物量が大きく減少するが、そのような条件下においても土壤固有のメタン生成古細菌群集が極めて低い転写活性を持ち、生残していると考えられた。また、メタン生成古細菌の *mcrA* 遺伝子数に対する転写産物数の比と土壤のメタン生成ポテンシャルとの間には正の相関関係が認められた。以上より、田畑輪換における 1 年以上の畑転換は活性を有するメタン生成古細菌の群集構成と存在量に大きな影響を及ぼすが、土壤固有の菌群は極めて低い転写活性を保持し生残す

ることを明らかにした。

以上のように、本研究は長期の湛水あるいは落水による水管理および大気 CO₂ 濃度増加処理が行われている水田圃場における土壌中のメタン生成古細菌の群集構成と存在量を明らかにすることにより、それらの群集の動的变化と安定性について高い新規性を有する知見を得ており、水田土壌におけるメタン生成機構の解明と水田圃場からのメタン発生の制御・低減のため活用が期待される。これらの成果は、水田土壌学および土壌微生物学の発展に大きく貢献するものであり、当審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

