

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 馬 場 竜 子

論 文 題 目

水田土壌の水素生成微生物群集に

関する研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学講師	渡 邊 健 史
委 員	名古屋大学教授	小 林 哲 夫
委 員	名古屋大学教授	浅 川 晋
委 員	名古屋大学准教授	村 瀬 潤

論文審査の結果の要旨

湛水された水田土壌では、土壌中の酸素が微生物により速やかに消費されるため、嫌氣的・還元的な環境となる。このような環境条件下では、有機物は多様な嫌気性微生物が関わる段階的な分解過程を経て、最終的にメタンと二酸化炭素にまで分解される。水素は、嫌氣的有機物分解過程の一次発酵、二次発酵反応において、微生物が余剰な還元力を捨てる手段として生成される。生成された水素はより下流の分解過程において電子供与体として利用されるため、水素生成微生物が嫌氣的有機物分解過程の中で担う役割は極めて重要である。しかし、水田土壌中の水素生成微生物群集の生態に関する知見はこれまで皆無であった。これは、系統的・生理的に多様な微生物が水素生成能を持つことや、土壌中では水素生成反応と消費反応が同時に進行することから、土壌中の水素生成微生物の生態を群集レベルで評価することや、水素生成のみに着目することが困難であったためである。しかし、近年、環境中の水素生成微生物の研究に、酵素ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をマーカーとした解析が試みられている。ヒドロゲナーゼは活性部位に含まれる金属の違いにより、大きく [NiFe]-、[FeFe]-、[Fe]-ヒドロゲナーゼの 3 種類に分類されるが、このうち [FeFe]-ヒドロゲナーゼは主に嫌気性菌および一部の真核生物に存在し、嫌気環境中での水素生成反応を担うと考えられている。本学位論文では、水素生成微生物が保有する [FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性サブユニットをコードする遺伝子 *hydA* をマーカーとして利用し、水田土壌の水素生成微生物の多様性と動態について解析を行った。本研究の成果の概要は次の通りである。

第 2 章では、水田土壌に存在する水素生成微生物の群集構造を明らかにすることを目的として、まず水田土壌から抽出した土壌微生物 DNA の *hydA* 遺伝子を対象とした PCR-クローンライブラリー法および PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法による解析手法を確立した。既知の *hydA* を対象とした 3 種類のプライマーセットの適用可能性を検討し、水田土壌の水素生成微生物の解析に最も適したプライマーを選び出した。そのプライマーを用いた解析から、水田土壌には Firmicutes 門、Chloroflexi 門、Proteobacteria 門の細菌を中心とした多様な水素生成微生物が存在することが示唆された。さらに、2 地点の水田土壌から経時的に採取した土壌中の微生物の *hydA* 遺伝子のパターンを PCR-DGGE 法により解析し、水田土壌の水素生成微生物の群集構造は、湛水、落水を問わず年間を通じて安定していることを明らかにした。

第 3 章では、土壌中で活性を有する水素微生物群集を明らかにすることを目的として、水田土壌をそのまま、あるいは基質として稲わらを添加して嫌氣的に湛水培養し、経時的に採取した土壌を対象に *hydA* 遺伝子および *hydA* 転写産物の PCR-クローンライブラリー法および PCR-DGGE 法による解析を実施した。その結果、稲わら添加土壌培養 1 日目 (無機物質の逐次還元過程が活発に進行している段階の初期)、14 日目

(メタン生成期に移行した段階)、稲わら無添加土壌培養 14 日目 (穏やかな逐次還元過程が進行している段階) のそれぞれで、土壌中の *hydA* 転写産物の構成が大きく異なることを示した。すなわち稲わらを含む土壌の逐次還元過程の初期では *Proteobacteria* 門のごく限られたグループと *Firmicutes* 門の微生物の *hydA* が高い割合で転写されており、特定の微生物群が水素生成活性を上昇させることが示唆された一方で、メタン生成期では転写される *hydA* の多様性が増大し、*Firmicutes* 門を中心に多様な微生物群が水素生成を担うことが推定された。さらに、稲わら無添加の土壌では、稲わら添加土壌メタン生成期に比べて転写される *hydA* の多様性が低く、より限られた微生物群が水素生成活性を有していたと考えられた。以上より、水田土壌で活性を有する水素生成微生物の群集構造は土壌の還元状態や有機物の有無および分解過程によりダイナミックに変化し、特にメタン生成過程で多様性が増大することを明らかにした。

第 4 章では、水田土壌から分離した水素生成活性を有する分離株、*Clostridium* sp. H2 株と *Desulfovibrio* sp. A1 株を用いて、水素生成活性を測定するとともに *hydA* パラログ間の転写活性の変化を qPCR 法により解析した。水素生成微生物にはゲノムに複数の *hydA* パラログを保有する菌が存在することが知られている。H2 株は 5 種類 (*H2hydA1*~*H2hydA5*)、A1 株は 2 種類 (*A1hydA1*, *A1hydA2*) の *hydA* パラログを有しており、水素生成時にこれらのパラログを周囲の環境に応じて使い分けている可能性があると考えられた。H2 株をグルコースを基質とした培地で生育させたところ、対数増殖期に高い水素生成活性がみられ、それと同時に *H2hydA3* の転写活性が増大することを示した。また、A1 株を乳酸塩と硫酸塩を基質とした培地で生育させる硫酸還元条件と、乳酸塩を基質とした培地でメタン生成古細菌と生育させる共培養発酵条件で培養を行ったところ、硫酸還元条件と共培養発酵条件では、2 種類の *hydA* の転写活性はそれぞれ異なっており、特に、A1 株がメタン生成古細菌に水素を供給する共培養発酵条件では *A1hydA2* の転写活性が増大することを示した。以上より、水素生成微生物は、水素生成時に *hydA* を転写するとともに、複数の *hydA* パラログを条件に応じて使い分けていることを明らかにした。

以上より、本学位論文では、水田土壌の水素生成微生物の多様性と動態を群集レベルで解析し、水田土壌に存在する水素生成微生物群集の特徴として高い多様性と安定性ととともに、有機物の分解過程や周囲の環境の変化に応答して水素代謝活性を少なくとも *hydA* の転写レベルで変化させるという環境応答性があることを明らかにした。本研究は、水田土壌中の水素生成微生物群集の生態や役割の一端を初めて明らかにした研究であり、その成果は関連する学問領域に極めて重要な知見を提供するものである。当審査委員会は、本論文の内容が博士 (農学) の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	馬場 竜子
試験担当者	主査 渡邊健史、小林哲夫、浅川 晋、村瀬 潤			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 2月10日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				