

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 謝 承 暉

窒素固定は大気中の窒素を生物が利用可能とするための重要な生化学反応である。窒素固定能はこれまで真核生物には見出されておらず、バクテリアとアーケアのみに見出されている活性で、バクテリア、アーケアの菌種における窒素固定能の分布は大きな多様性を示す。生物学的に固定された窒素は溶け出したり揮発化したりする傾向が弱いため、持続的に供給できるためことから農業利用の窒素源として大いに寄与する。穀類のような非マメ科植物に窒素固定能を付与することは生物学的窒素固定の分野の研究者にとっては長い間の夢である。そのような成果が得られる一つの方法は多くの分離源から窒素固定細菌を分離することである。本研究では窒素固定能を有する細菌の分離と系統関係を明らかにすることを目的としたものである。

第1章は序論で、研究の背景と本研究の意義について述べた。

第2章は材料と方法について述べた。

第3章では共生窒素固定細菌について述べた。根粒菌はマメ科植物の根や茎に根粒または茎粒を形成する。千葉県海岸に自生するミヤコグサ *Lotus japonicus* から2株の根粒から従来の *Rhizobium* 属とは異なる分離株 Ka912 と Y103A 株を得た。本菌株は16S rRNA 遺伝子と *recA* 遺伝子に基づく系統解析から *Aminobacter* 属細菌であることが判明した。両株ともミヤコグサおよび西洋ミヤコグサに根粒を形成し、また根粒形成に必要な *nodA* 遺伝子、および窒素固定に必要な *nifH* 遺伝子を有することが判明した。遺伝子の系統解析の結果から、これらの株では根粒形成に必要な遺伝子は *Mesorhizobium* 属細菌から水平移動で伝搬されたことが示唆された。さらに、日本国内各地のミヤコグサ根粒から分離された根粒菌について系統解析を行った結果、分離株は *Mesorhizobium* 属に種のレベルで異なることが判明した。このことはミヤコグサ根粒菌は *Mesorhizobium* 属に広く散在し、それは共生アイランドが種レベルまたは属レベルで異なる異種へ伝搬された結果生じたものと推定された。また多くの根粒菌について *nodA* と *nifH* 遺伝子配列を調べ、系統解析を行った結果、両遺伝子は共進化をしたという証拠はなかった。

第4章では酸素非発生型光合成窒素固定菌について述べた。光合成は光エネルギーを用いて有機化合物の合成を行う物理化学的過程であり、植物、藻類、光合成細菌によって行われる。光合成細菌は光合成以外に窒素固定も行う。稲からの分離株である R5, R12, R2 株と、地衣類から分離した O5 株はバクテリオクロフィル *a* を有し、嫌氣的に光合成反応を行う細菌である。16S rRNA, *gyrB*, *nifH*, および *pufLM* 遺伝子に基づく系統解析および表現形質の解析からこれらの菌株は *Rhodospseudomonas* 属の異なる2種であることが判明した。地衣から分離され、好気性で嫌氣的に光合成を行う細菌株、MCW は好気条件で赤色色素を生成し、16S rRNA, *nifH*, *pufLM* 遺伝子に基づく系統解析から本菌株は α -*Proteobacteria* の新属であることが判明した。

第5章では非共生型窒素固定細菌について述べた。非共生型窒素固定細菌は好気条件で窒素を固定することができる。このような細菌のニトロゲナーゼ活性はアセチレン還元活性および *nifH* 遺伝子の検出により容易に検出できる。地衣から分離した O8 株と土壌から分離した Ka03 株は

それぞれ *Xanthobacter* 属と *Paenibacillus* 属菌種に近縁であることを見出した。

第6章では小柳津-増地と駒形によって分離された、稲または稲根圏からの窒素固定細菌株14株について系統的な位置を調べた。これらの株の株は分子系統解析が行われてこなかったため、分類学的な位置が不明のまま保存されてきた株である。16S rRNA, *nifH*, *recA* 遺伝子に基づく系統解析の結果と既に得られていた以前のデータとを合わせ、これらの株は何れも新規の株であり、新属ないしは新種に同定された。それらは、*Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov.; *Azospirillum oryzae* sp. nov.; *Zoogloea oryzae* sp. nov.; *Sphingomonas azotifigens* sp. nov.; *Amorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov. とすることを提唱した。

第7章ではこれまで系統解析が不十分で問題を含んでいる分類群 *Derxia gummosa*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas saccharophila*, *Azotobacter* 属, *Azomonas* 属, *Azorhizophilus* 属について、これらの分類群の系統解析を行った。そして、*Derxia* 属の修正、*A. latus* を新属 *Azohydromonas* 属に移行してそれぞれ *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., および *Azohydromonas australica* sp. nov. とすること、*Pseudomonas saccharophila* を新属 *Pelomonas* 属に移行して *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov. とすること、*Azorhizophilus paspali* は *Azotobacter* 属に移行して *Azotobacter paspali* sp. nov. comb., nov. とすることをそれぞれ提唱した。

第8章では窒素固定細菌全体の系統関係について述べた。これまで窒素固定能を有する細菌種として145属、270種が知られている。そのうち100種の *nifH* 遺伝子が解析されている。この遺伝子の塩基配列を用いて系統樹を作成したところ、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹と比較して、いくつかの種で遺伝子の水平移動が起こったものと推定される結果が得られた。

第9章では窒素固定細菌分離の過程で分離された非窒素固定細菌の分類学的な位置を明らかにした結果について述べた。

第10章は考察である。

以上、本論文は新たに分離された窒素固定細菌の系統分類学的な位置を明らかにしたもので、学術上、応用上、貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。