

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岸本 高充

ハーバー・ボッシュ法による化学窒素肥料の製造と緑の革命による多収量穀物の創出は、人類の食糧に対する危機を大きく救った。しかしこの農業は、大量の化学窒素肥料の投入にともなう環境汚染をまねくとともに、ハーバー・ボッシュ法のための化石燃料の大量消費という問題もまねいている。これへの対応策として世界中で考慮されているのが、窒素固定細菌の生物窒素肥料としての利用である。本研究は、日本の稲作における生物窒素肥料の活用を実現するためにイネの体内に棲息する窒素固定エンドファイトを探索することを目的とし、イネから分離した窒素固定複合細菌系について解析したものである。

本論文は5章からなる。第1章の序論では登熟期のコシヒカリの止葉からは *Microbacterium* 属細菌と *Sphingomonas* 属細菌が優占して分離されるとの報告が紹介され、これに基づいて、第2章でイネからの好気性窒素固定エンドファイトとしての *Sphingomonas* 属細菌の分離が目指された。農家の水田より採取した登熟期コシヒカリの止葉からの分離作業により、多数の *Pantoea* 属細菌とその他の細菌が分離された。これらの細菌の詳細を調べるなかで、イネの籾に接種することでエンドファイト能を評価する実験系を確立するとともに、16S rDNA の塩基配列を指標に *Microbacterium* 属細菌として認識するためには汎用される PCR プライマー (B8F と B1500D) では不十分であることを見出したものの、目的とする *Sphingomonas* 属窒素固定細菌を得ることはできなかった。

第3章では、前章の結果に鑑みて好気性窒素固定細菌をよりの確に分離する作業が行われた。登熟期コシヒカリ止葉より無窒素培地を用いて分離された 1505 コロニーに対して直ちに窒素固定能の評価方法の一つであるアセチレン還元能が測定され、1コロニー (F-I-50) に絞り込まれた。このコロニーより抽出したゲノム DNA で 16S rDNA の塩基配列解析がなされ、このコロニーには *Sphingomonas* 属細菌とともに他の細菌が混在していることが示された。そこで、F-I-50 を無窒素培地で継代培養する中で強いアセチレン還元能を示す複合系 (F-I-50S) が集積された。F-I-50S は、高層軟寒天無窒素培地で培養する際の気相が空気の場合のみアセチレン還元能を発揮する。F-I-50S からの好気性細菌の分離作業が繰り返され、*Bacillus* 属細菌、*Microbacterium* 属細菌、*Sphingomonas* 属細菌、*Variovorax* 属細菌の4細菌が単離された。ジニトロゲナーゼレダクターゼの遺伝子 (*nifH*) を標的としたサザンハイブリダイゼーションでは、*Microbacterium* 属細菌が *nifH* を有する結果が得られたが、これらの細菌を単独で、ならびに各種に混合して培養しても F-I-50S のアセチレン還元能を再現することはできなかった。

第4章では、F-I-50S からの嫌気性細菌の分離作業が行われた。その結果、*Anaerospora*

属細菌 (*Anaerospira* sp. TK51) が分離された。TK51 株と、第 3 章で分離されていた 4 種の細菌を混合して培養したところ、F-I-50S のアセチレン還元能が再現された。ところが、TK51 株を窒素固定能を持たない大腸菌と混合培養した場合にもアセチレン還元能が確認された。そこで、TK51 株の *nifH* が PCR によって調べられ、増幅断片の塩基配列から *Clostridium* 属細菌の *nifH* と相同性を示すものを有することが示された。ところが TK51 株は単独で培養するとアセチレン還元能を示さなかった。そこで、好気性細菌を培養して調製したコンディションド培地や、アミノ酸を添加した培地等が試されたが、これらの条件では TK51 株はアセチレン還元能を示さず、最終的には共存する好気性細菌が増殖することが TK51 株のアセチレン還元能発揮に必要であると結論された。また、TK51 株と 4 種の細菌を混合してイネの籾に接種することでエンドファイト能が調べられ、成長した苗の葉からアセチレン還元能を有するコロニーが回収された。このコロニーは、TK51 株と *Microbacterium* 属細菌、あるいは TK51 株と *Sphingomonas* 属細菌の複合系であった。

以上、本研究は、イネの窒素固定エンドファイトである複合細菌系を取得し、その中の窒素固定細菌が嫌気性 *Anaerospira* 属細菌であることを明らかにした。さらに、この細菌の窒素固定能発揮には好気性細菌との共存が必要であること、そして複合細菌系としてイネのエンドファイトとなることを示したものであり、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。