

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 英臣

水田土壌は他の環境とは異なり、耕作期間の水管理によって土壌環境が好氣的にも嫌氣的にも変化する環境である。このような特徴を持つ水田土壌の微生物群集構造を解析するために、これまでに様々な方法が導入されてきたが、近年、塩基配列のシーケンシング技術が飛躍的に進歩を背景に、新たなシーケンシング技術が環境 DNA や RNA を大量・包括的にシーケンスするメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析の分野にも応用されるようになってきている。本研究は、新潟県農業総合研究所内の連作水田を実験圃場とし、以下の二点を目的としている。すなわち (1) 新たなシーケンシング技術を用いたメタゲノム解析により、水田土壌に存在する微生物や機能遺伝子の群集構造、および水田土壌の還元反応に関与する微生物群を詳細に明らかにすること、(2) メタトランスクリプトーム解析を行い、水田土壌の微生物群集構造や機能遺伝子群の組成が湛水や落水によって、どのように応答し変動するのか明らかにすること。(1)、(2)を通して、従来よりも詳細・網羅的な水田土壌微生物群集と機能の全体像の解析を試みている。

第 1 章では水田土壌の特徴とこれまでの水田土壌微生物に関する研究アプローチについて概説したのち、メタゲノム解析・メタトランスクリプトーム解析の有効性を挙げて、本研究の目的について述べている。

第 2 章、第 3 章では実験圃場の土壌環境メタデータの取得と従来法による微生物群集の予備的な解析について述べている。第 2 章では耕作期間における連側的な土壌サンプリングと合わせて、実験圃場の土壌理化学性・生物活性の測定を行った。第 3 章では採取した土壌から DNA と RNA を抽出し、細菌およびアーキアの 16S rRNA 遺伝子および 16S rRNA をターゲットとした PCR-DGGE、クローンライブラリー解析による微生物群集の予備的な解析を行った。

第 4 章では、湛水前ならびに湛水期の土壌 DNA のメタゲノム解析について述べている。水田土壌においては *Geobacter* 属や *Anaeromyxobacter* 属細菌が優占していることが明らかとなった。また、水田土壌において進行する各還元反応に関与する鍵酵素の遺伝子群の組成を調べたところ、脱窒反応の一部の一酸化窒素還元を触媒する酵素の遺伝子、および一酸化二窒素還元を触媒する酵素の遺伝子の配列は、よく知られた脱窒菌よりも、脱窒菌ではない *Geobacter* 属や *Anaeromyxobacter* 属細菌由来の配列に近縁なものが多く検出された。このことから、水田土壌の脱窒反応において脱窒菌ではない細菌が部分的に脱窒反応に関与している可能性がはじめて示唆された。

第 5 章では、湛水期と非湛水期の土壌 RNA のメタトランスクリプトーム解析について述べて

いる。水田土壌では耕作期間を通して *Geobacter* 属や *Anaeromyxobacter* 属細菌の優占率が高いことが分かった。また、湛水期や非湛水期に特異的に活性が上昇するグループの構成を明らかにした。水田土壌の還元反応に関与する機能遺伝子群については、湛水期にメタン生成に関与する機能遺伝子の転写量が増大することが示された。

第 6 章では、メタゲノム解析から新たに見出されたユニークな非脱窒型 N_2O 還元微生物の *Anaeromyxobacter* 属細菌の単離と農耕地土壌における分布について述べている。新潟水田土壌から *Anaeromyxobacter* 属細菌の単離に成功し、 N_2O 還元活性を有する可能性があることを示した。さらに、日本各地の水田土壌においても、細菌群集の中で *Anaeromyxobacter* 属細菌が同程度に優占している一方、畑土壌や他の環境では、*Anaeromyxobacter* 属細菌の全細菌に対する割合が水田土壌に比べて小さいことを明らかにした。このことは *Anaeromyxobacter* 属細菌が一般的に水田土壌において優占度が高い傾向がある可能性を示唆している。

以上、本研究においてメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を水田土壌にはじめて適用し、水田土壌微生物の優占種や各還元反応に関与する機能微生物群集の構造をこれまでよりも詳細に明らかにした。さらに、メタゲノム解析から見出されたユニークな微生物を単離し、脱窒反応において脱窒菌だけでなく、脱窒反応を部分的に行う細菌も関与している可能性があることをはじめて見出した。本研究が提供する知見は、水田土壌学の分野は言うまでもなく、他の環境微生物生態学の研究者にとっても非常に有益な情報源となることに加え、今後、地球規模の窒素循環に関与する微生物群集を考察する上で大きな意義をもち、学術的・応用的に貢献するところは少なくない。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。