

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊知地 稔

本研究は、海洋生態系における重要な反応過程である硝化に関わるアンモニア酸化古細菌 (AOA) について、その生理生態学的特性と古細菌ドメインにおける系統学的な位置を明らかにすることを目的としたものである。

1. 駿河湾における海洋性アンモニア酸化古細菌の分布と生息場所

海洋性 AOA 群集は、アンモニア酸化の鍵酵素遺伝子 (*amoA*) によって、*Nitrosopumilus maritimus*-like cluster (NM)、Water Column cluster A (WCA)、Water Column cluster B (WCB) の 3 系統群に分類される。付着と自由生活という海洋微生物の二つの生態型に注目し、駿河湾における AOA の分布と多様性を解析し、系統群による分布や生息場所の違いを明らかにした。鍵酵素 *amoA* 遺伝子をターゲットとする定量 PCR 法及び PCR クローニング法を用いた解析の結果、海水環境中における AOA の大部分は、自由生活性である事を初めて明らかにすることができた。一方、付着性 AOA は単位海水当たりの現存量は少ないものの、*amoA* 遺伝子配列にもとづく多様性解析により、自由生活性 AOA よりも多様性が高く、種数が多いことが示された。多くの海洋性 AOA は、低濃度のアンモニア態窒素利用に適応することによって自由生活性の分布を示しているが、有機物粒子の存在が AOA の多様性維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 海洋性アンモニア酸化古細菌の集積培養と群集構造の変化

海洋性 AOA の主要系統群 (NM、WCA、WCB) の分布を支配する要因を明らかにするため、アンモニアもしくは亜硝酸添加集積培養系を用いて、アンモニア態窒素濃度と水温の影響を調べた。駿河湾湾口部水深 500 m と 2,000 m の海水試料に基質として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ もしくは NaNO_2 を添加し、4°C、10°C、20°C に保持、1,200 日間の集積培養を行った。集積培養における系統群別のクローン出現頻度と現存量の変化を解析した結果、WCB 系統群の割合と培養期間中における消長は、培養温度によって大きく異なることが示され、海洋性 AOA の主要系統群の分布を支配する要因として、水温が重要な要因となりうることが初めて示された。また、NM+WCA 系統群は、WCB 系統群と比べてアンモニア態窒素に対する最大収量が高いことが示唆された。既往研究では、NM と WCA 系統群は水族館、沿岸、浅海で優勢、WCB は深海で優勢であることが報告されている。こうした分布の違いが、生

息環境におけるアンモニア態窒素濃度と水温の違いによって説明できる。また、同じ系統群内においても培養期間や温度によって出現する OTU が変化し、種レベルでの環境要因に対する応答の違いと群集構造の変動があることが示唆された。

3. 海洋性アンモニア酸化古細菌の系統

様々な海域で得た集積系をスクリーニングし、NM 及び WCA 系統群だけでなく、WCB 系統群が集積された系を見出し、従来不明であった海洋性 AOA 群の系統学的位置を明らかにした。駿河湾、相模湾、大槌湾、サロマ湖、北極海で海水試料を採取し、集積培養を行った。合計で 8 試料、73 の集積系について、定量 PCR 法による系統群毎の現存量計数を行った。北極海で得られた集積系を用いた解析の結果、WCB 系統群に属する AOA の 16SrRNA 遺伝子における系統学的位置として、NM 及び WCA 系統群も属する *Thaumarchaeota* の Group I.1a 内に確定することができた。WCB 系統群の古細菌は、分離株である *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* とは、異なるクラスターとして区別することができるが、その相同性は 97%程度であり種レベルで違いが示唆された。本研究によって、海洋性 AOA を構成する 3 つの主要系統群について、古細菌ドメインにおける系統学的な位置を初めて明らかにすることができた。また、3 つの主要系統群に含まれない新たな系統群の存在も示唆された。

以上、本研究によって、海洋性 AOA の海水中での鉛直的な棲み分け、付着と自由生活という二つの生態学的ニッチによる系統群分布パターンや多様性の違いが示され、こうした分布パターンを決める環境要因として、アンモニア態窒素濃度に加えて水温が主要な要因となりうるということが初めて明らかになった。さらに、未培養の海洋性 AOA クローンの 16SrRNA 遺伝子配列を決定することにより、古細菌ドメインにおける系統学的な位置が初めて明らかとなった。これらの成果は、当該分野の研究において少、なからず学術的に貢献するものである。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文としてふさわしいものであると認めた。