

学位論文題名

北方林の窒素循環における土壌細菌の寄与に関する研究

学位論文内容の要旨

北方の森林では可給態窒素が樹木生育の制限要因になっている場合が多く、窒素循環の解明は今後起こりうる気候変動が森林生態系に与える影響を推測する上で重要である。森林生態系への窒素供給源の一つとして土壌中の単生窒素固定細菌による窒素固定があるが、その鍵反応を担うニトロゲナーゼは酸素濃度に敏感なため、バルク土壌そのものの窒素固定量を正確に測定することは難しい。その理由から、人工培地で土壌微生物を培養して培養物の窒素固定能を測定することにより、対象となる土壌の窒素固定ポテンシャルを検出する場合がある。東シベリア・ヤクーツク近郊の永久凍土上に成立したグイマツ林(62°02'N, 128°49'E)では、収支計算によると年間 13 kg/ha 以上の“出所不明”な窒素が土壌中に供給されていることになるが、土壌や植物根を窒素固定細菌に汎用される培地で培養しても窒素固定活性はほとんど検出されない。本研究では土壌微生物培養法を改変し、アセチレン還元法によって土壌微生物群集の窒素固定ポテンシャルを評価した。この培養法を用いて、分離細菌株同士の相互作用が窒素固定に及ぼす影響や、スカンジナビア北部・亜北極ツンドラ域での土壌窒素固定ポテンシャルの強弱を調べ、北方林における窒素ミッシングリンクの謎の一端を解明した。

1. 培地ゲルマトリックスの検討

土壌中の窒素固定細菌培養には 0.2%寒天をゲルマトリックスとしたソフトゲル培地が汎用されるが、東シベリア・タイガ林・林床土壌の微生物群集は窒素固定能をほとんど発揮しなかった。当研究室では、植物根面の窒素固定細菌の分離・培養における 0.3%ジェランガムソフトゲルの有効性を見出していたため、これらの微生物群集にもジェランガムソフトゲル培地による培養を試行した。その結果、液体培地や寒天ソフトゲル培地中ではほとんどアセチレン還元能を示さない土壌微生物群集が、ジェランガムソフトゲル培地中では高いアセチレン還元能を示すことが分かった。同様の傾向は、分離した窒素固定細菌株や亜北極ツンドラ域の土壌微生物群集でも確認された。また、土壌微生物群集をジェランガムソフトゲル培地中で培養した培養物から、低窒素平板培地を用いて *Pseudomonas* 属および *Burkholderia* 属の窒素固定細菌株数株を分離・同定した。

2. 炭素源、その濃度、培養温度、培地 pH の検討

炭素源を 0.05%の D-mannitol、培養温度を 10°Cから 15°C、培地 pH を 6.0 としたとき最も高いアセチレン還元が認められた。このうち、特に培養温度の影響は大きく、30 cm 深度の無機質土壌由来の微生物群集は 15°Cで最も高い活性を示したが、20°Cあるいは 25°Cでは著しく減少した。一方、mannitol は有機物層のメタノール抽出物に粗抽出物総重量 3.0%以上の割合で含まれており、自然界においても有機物層の mannitol は単生窒素固定細菌にとって重要な炭素源であることが示唆された。このように、培養条件を現地土壌環境に近づけることが北方林土壌微生物群集の窒素固定能検出に重要であることが示された。30 cm 深度土壌培養物から DNA を回収し、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)により細菌叢を解析したところ、主要なバンドは培養物から分離した窒素固定細菌株(*Burkholderia xenovorans*)と一致した。

3 分離株の相乗効果

分離した窒素固定細菌は単独培養では分離源である微生物群集混合培養物ほどの活性を示さなかったため、同じ培養物から分離した非窒素固定細菌との1対1混合培養による活性の相乗効果を検討した。30 cm 深度土壌培養物から分離された窒素固定細菌と非窒素固定細菌の1対1の共培養試験では、*Pseudomonas* sp.と*Luteibacter* sp.または、*Luteibacter* sp.と*Burkholderia* sp.の組み合わせで、それぞれの単独培養時と比較してアセチレン還元が上昇した。濁度から見積もった菌体量とアセチレン還元との間に正の相関が見られたため、非窒素固定細菌との共培養による窒素固定の上昇は窒素固定細菌の増殖促進によると考えられた。

4. 亜北極ツンドラ域の土壌窒素固定ポテンシャルの検出

フィンランド北部・Kilpisjärvi 周辺 (69°05'N, 20°46'E) には、森林から亜北極ツンドラ域へ遷移する森林限界が存在する。森林限界付近のヨーロッパアカマツ林、カンバ林、亜北極ツンドラ域それぞれの土壌微生物群集をジェランガムソフトゲル培地で培養し、アセチレン還元試験に供したところ、亜北極ツンドラ域でのみ高い活性が検出された。各土壌から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子および窒素固定酵素の一部をコードする *nifH* 遺伝子をターゲットとした DGGE による菌相解析を行ったが、バンドパターンが複雑で、亜北極ツンドラ域土壌の窒素固定に関わる主要な細菌の特定には至らなかった。そこで、亜北極ツンドラ域の土壌を培地炭素源濃度および培養温度の勾配がある条件で培養し、各培養条件でのアセチレン還元と、培養物から回収した DNA での菌相解析の結果を比較した。16S rRNA 遺伝子を標的とした菌相解析から、*Clostridium* 属細菌や *Duganella* 属細菌がジェランガムソフトゲル培地中での主要細菌と考えられ、*nifH* 遺伝子を標的とした菌相解析では培養物中の主要な窒素固定細菌として *Mesorhizobium* 属細菌や *Geobacter* 属細菌の存在が示された。

スウェーデン北部・山岳地帯の Abisko 周辺 (68°18'N, 19°10'E) では、標高 600 m 付近でカンバ林から亜北極ツンドラ域に遷移する。この森林限界付近では地表を覆う植生が2種類あり、ツツジ科植物などの低木が優占する植生は heath、草本植物が優占する植生は meadow と呼ばれている。森林限界付近のカンバ林内と亜北極ツンドラ域それぞれの heath と meadow で土壌を採取し、ジェランガムソフトゲル培地で培養してアセチレン還元試験に供したところ、いずれも meadow 土壌は高いアセチレン還元を示し、heath 土壌はほとんど活性が検出されなかった。このことから、Abisko 周辺の森林限界付近では、heath に生育するツツジ科植物が土壌窒素固定を制御している可能性が示唆された。

5. 寒天粉末に含まれるフランカルボン酸類縁体が細菌の挙動に及ぼす影響

東シベリア・タイガ林・林床土壌から分離された *Pseudomonas collierea* V5-G'5 株は、ジェランガム平板培地上ではスウォーミングによって幅の広いコロニーを形成するが、同濃度の寒天を含む平板培地上では一般的な小円形のコロニーを形成する。ゲルマトリックスの違いで細菌の挙動が異なる原因物質の一つとして、寒天粉末に含まれる 5-hydroxymethylfuran-2-carboxylic acid および furan-2-carboxylic acid を単離した。スウォーミング抑制活性の力価から、これらの物質が寒天平板培地とジェランガム平板培地で挙動が異なる原因の一部であり、極微量で細菌の挙動に影響を与えることを確認した。また、これらの化合物が、寒天平板培地に含まれる濃度で大腸菌のスウォーミングを抑制し、フィンランドの亜北極ツンドラ域土壌から分離された放線菌のコロニー形成に影響することを見出した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	橋床泰之
副査	教授	小池孝良
副査	教授	波多野隆介
副査	准教授	橋本誠

学位論文題名

北方林の窒素循環における土壌細菌の寄与に関する研究

本論文は和文 196 頁，図 84，表 39，16 章からなり，参考論文 3 編が付されている。

北方の森林では可給態窒素が樹木生育の制限要因になっている場合が多く，窒素循環の解明は今後起こりうる気候変動が森林生態系に与える影響を推測する上で重要である。土壌中の単生窒素固定細菌による窒素固定は森林生態系への窒素供給源候補としての位置にあるものの，アセチレン還元法によって北方林・林床のバルク土壌そのものの窒素固定量を測定した場合，その値は限りなくゼロに近い。そもそも窒素固定の鍵反応を担うニトロゲナーゼは酸素濃度に敏感なため，バルク土壌そのものの窒素固定量の正確な測定は困難とされている。東シベリア・ヤクーツク近郊の永久凍土上に成立したグイマツ林 (62° 02' N, 128° 49' E) では，年間 13 kg/ha 以上の“出所不明”な窒素が系内に供給されているとの報告がある。実際，土壌や植物根を窒素固定細菌に汎用される培地で培養しても窒素固定活性はほとんど検出されず，いわゆる「北方林の窒素ミッシングリンクの謎」が存在する。本学位論文研究では，人工培地で北方林・林床土壌の土壌微生物の培養法を検討・改変し，アセチレン還元法によって林床土壌の窒素固定ポテンシャルを検定した。特にアセチレン還元に供する土壌微生物群集の培養条件を改変し，被検土壌微生物群集の窒素固定潜在能力を評価した。この方法により，分離細菌株同士の相互作用が窒素固定に及ぼす影響や，植生による土壌窒素固定ポテンシャルの強弱を調べ，北方林における「窒素ミッシングリンクの謎」の一端を解明した。審査に付した主な研究内容は以下のとおりである

1. 培地ゲルマトリックスの検討と培養可能な土壌細菌の分離

植物根と半共生状態にある単生窒素固定細菌の培養には，0.2%寒天をゲルマトリックスとしたソフトゲル培地が汎用されるが，この培地では東シベリア・タイガ林・林床土壌の微生物群集はほとんどアセチレン還元を示さなかった。そこでゲル基材を 0.3%ジェランガムに置き換え，これらの微生物群集の培養とアセチレン還元を試みた。その結果，これらの土壌微生物群集がジェランガムソフトゲル培地中で高いアセチレン還元を示すことを明らかにした。同様の傾向を，分離した窒素固定細菌株や亜北極ツンドラ域の土壌微生物群集でも確認した。また，土壌微生物群集をジェランガムソフトゲル培地中で培養した培養物から培養可能な菌株 160 余株を分離し，その 16S rRNA 遺伝子塩基配列決定法によってこれらのほぼ全てを属レベルで同定した。全分離株をアセチレン還元試験に供し，6 株の単生窒素固定細菌を得た。これらは *Pseudomonas* 属，*Burkholderia* 属ならびに *Luteibacter* 属細菌であることを示した。

2. 炭素源，その濃度，培養温度，培地 pH の検討

グイマツ土壌微生物群集が最も効率よく窒素固定を行う環境条件を検討した。その結果，炭素源を 0.05%の D-mannitol，培養温度を 10℃から 15℃，培地 pH を 6.0 としたとき最も高いアセチレン還元を認めた。このうち，30 cm 深度の無機質土壌由来の微生物群集は 15℃で最も高い活性を示したが，20℃あるいは 25℃では活性は著しく減少し，最適な温度が窒素固定能の検出には重

要であることを実験的に示した。一方, mannitol が土壌有機物層に乾燥重 kg あたり 2.1 g 以上の割合で含まれていることを明らかにし, 自然界においても mannitol が重要な炭素源である可能性を示した。30 cm 深度土壌培養物から回収した DNA を用い, 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) により培養細菌叢を解析し, 主要なバンドが培養物から分離した窒素固定細菌株 (*Burkholderia xenovorans*) と一致することを示した。

3. 分離株の相乗効果

分離した窒素固定細菌が単独培養では分離源である微生物群集混合培養物ほどの活性を示さなかった事実に着目し, 同じ培養物から分離した非窒素固定細菌との 1 対 1 混合培養による活性の相乗効果を検討した。30 cm 深度土壌培養物から分離した窒素固定細菌と非窒素固定細菌の 1 対 1 の共培養試験で, *Pseudomonas* sp. と *Luteibacter* sp. または, *Luteibacter* sp. と *Burkholderia* sp. の組み合わせで, それぞれの単独培養時と比較してアセチレン還元が上昇することを示した。濁度から見積もった菌体量とアセチレン還元との間にある正の相関を見だし, 非窒素固定細菌との共培養による窒素固定の上昇が窒素固定細菌の増殖促進によると結論した。

4. 亜北極ツンドラ域の土壌窒素固定ポテンシャルの検出

フィンランド北部・Kilpisjärvi 周辺 (69° 05' N, 20° 46' E) に分布する森林から亜北極ツンドラ域へ遷移する森林限界を研究フィールドとして, 森林限界付近のヨーロッパアカマツ林, カンバ林, 亜北極ツンドラ域それぞれの土壌微生物群集の窒素固定ポテンシャルをジェランガムソフトゲル培地による培養法で調べ, 亜北極ツンドラ域でのみ高い活性を検出した。各土壌から DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子および窒素固定酵素の一部をコードする *nifH* 遺伝子をターゲットとした DGGE による菌相解析を試み, 各培養条件でのアセチレン還元量と, 培養物から回収した DNA での菌相解析の結果から主要な窒素固定細菌の同定を試みた。16S rRNA 遺伝子を標的とした菌相解析から, *Clostridium* 属細菌や *Duganella* 属細菌をジェランガムソフトゲル培養物の主要細菌として同定し, *nifH* 遺伝子を標的とした菌相解析では *Mesorhizobium* 属細菌や *Geobacter* 属細菌のものに近い配列が存在することを明らかにした。

スウェーデン北部の, 標高 600 m 付近でカンバ林から亜北極ツンドラ域に遷移する Abisko 周辺 (68° 18' N, 19° 10' E) の山岳地帯をフィールドとして, この森林限界付近で特徴的な 2 種類の地表植生, ツツジ科植物などの低木が優占する heath ならびに草本植物が優占する meadow について, それぞれ森林限界付近のカンバ林内と亜北極ツンドラ域で双方の土壌を採取し, ジェランガムソフトゲル培地でこれを培養してアセチレン還元試験に供した。その結果, いずれも meadow 土壌が高いアセチレン還元を示し, heath 土壌ではほとんど活性が検出されないことを確認した。この結果から, Abisko 周辺の森林限界付近では, meadow が周辺地域の窒素供給ホットスポットとして機能している可能性について考察を加えた。

5. 寒天粉末に含まれるフランカルボン酸類縁体が細菌の挙動に及ぼす影響

東シベリア・タイガ林・林床土壌から分離された *Pseudomonas collierea* V5-G' 5 株が, ジェランガム平板培地上ではスウォーミングし, 同濃度の寒天平板培地上ではスウォーミングしないことを見いだした。その原因物質を探索し, 寒天粉末から 5-hydroxymethylfuran-2-carboxylic acid および furan-2-carboxylic acid を単離した。これらの化合物が, 寒天平板培地に含まれる濃度で大腸菌のスウォーミングを抑制することを発見した。

以上の研究内容は 2 編の学術論文として Applied and Environmental Microbiology ならびに Soil Science and Plant Nutrition にそれぞれ筆頭著者で発表されており, 特に前者は既に 6 回の被引用があり, 高い評価を受けている。他に, 第二著者となっている学術論文が一報ある。

よって, 審査員一同は, 原新太郎が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。