

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	天野 皓己
論文題目	A molecular ecological study on anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in coastal sediment (沿岸堆積物に生息する嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)微生物の分子生態学的研究)		
(論文内容の要旨)			
沿岸域・淡水域において顕在化している富栄養化等の環境問題を改善するため、水圏環境における窒素動態の解明が重要である。とりわけ、N_2生成反応は系外への窒素の除去を意味することから注目に値する。従来、NO_3^-あるいはNO_2^-を段階的に還元する脱窒細菌が主にN_2生成を担うと考えられてきた。しかしながら近年、嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）反応と呼ばれる、従来の脱窒とは異なる機構でN_2を生成するアナモックス細菌が発見された。アナモックス細菌の分離培養系は現在も確立されておらず、海洋の貧酸素水層や大陸棚堆積物を対象とした研究が進行する一方、富栄養湖を含む沿岸域におけるアナモックス細菌の知見は不足している。そこで、本研究では特に富栄養湖を含む沿岸域に生息するアナモックス細菌に注目し、窒素安定同位体$[^{15}N]$を用いたアナモックス反応活性測定およびアナモックス細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたPCR法によって、湖沼、河川および海洋沿岸域堆積物におけるアナモックス細菌の分布と生態学的特徴を明らかにすることを目的とした。			
1. 沿岸堆積物におけるアナモックス活性の存在およびアナモックス細菌の多様性 アナモックス反応に特徴的とされる「NO_2^-とNH_4^+のNに由来するN_2生成」を検出するため、堆積物にNO_2^-およびNH_4^+をどちらか一方だけ$[^{15}N]$標識して添加し、培養中に生成したN_2量を$^{14}N^{14}N$、$^{14}N^{15}N$、$^{15}N^{15}N$毎にGC-MSを用いて定量した。$[^{15}N]$標識率に基づいてアナモックスあるいは脱窒によるN_2生成量を求め、その速度（潜在活性）を算出した。その結果、霞ヶ浦北浦（北浦）、琵琶湖、淀川、瀬戸内海、ベトナムのマングローブ林やエビ養殖池の堆積物からアナモックス潜在活性が検出され、その活性は北浦堆積物では従来の脱窒潜在活性の62%に相当したが、他の堆積物では最大6%と地点間で大きく異なった。 アナモックス潜在活性が確認された堆積物試料からDNAを抽出し、既知のアナモックス細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたPCRを行った結果、すべての試料からアナモックス細菌由来と考えられる16S rRNA遺伝子が検出された。既知のアナモックス細菌はその塩基配列から5系統タイプ（A/B/K/Sw/Ss）に分類されるが、淡水域堆積物ではA/B/Kタイプ、汽水域堆積物ではSwタイプ、海域堆積物ではSsタイプが優占していた。この結果から、塩分濃度に応じて生息するアナモックス細菌が異なる可能性が判明した。 そこで、以降はアナモックス潜在活性が最も高かった北浦（富栄養淡水湖）に注目し、詳細な研究を行った。			
2. 北浦の堆積物に存在するアナモックス潜在活性の長期観測 北浦においてアナモックス潜在活性の水平分布を予備的に調べた結果、その分布が底層水中のNO_3^-濃度分布と同様の傾向を示したことから、長期観測によって両者の関係をより詳細に明らかにしようとした。2005年8月から2007年10月までKU3、KU4およびKU6の3定点で(1)アナモックスおよび脱窒の潜在活性測定、(2)水質測定、(3)定量的PCR法によるアナモックス細菌数の定量を行った。KU3は予備調査でアナモックス潜在活性が最も高かった地点であり、KU6は活性がほぼ検出されなかった地点、KU4は			

その中間の地点である。その結果、アナモックス潜在活性は季節によらずKU3地点で最も高く、ついでKU4地点でKU3地点の1/2から1/3、そしてKU6地点では0に近い値であった。底層水中の NO_3^- 濃度を測定した結果、KU3地点では通常 $250 \mu\text{M}$ 以上であったがKU4地点では半減し、KU6地点ではさらに低い濃度であった。堆積物間隙水中の NO_3^- 濃度も同様にKU3>KU4>KU6の順に減少した。

そこで、KU3地点における NO_3^- 濃度の季節変動を調査した結果、底層水中の NO_3^- 濃度は夏季、特に6月に減少し、2006年、2007年ともに $60 \mu\text{M}$ 以下であった。堆積物間隙水中の NO_3^- 濃度も同様に夏季に減少した。一方、アナモックス潜在活性は他の季節と比べてやや低いものの、両年6月にも検出された。また、アナモックス細菌の全細菌に対する存在比も両年6月に減少する傾向は認められず、アナモックス細菌は常に存在していた。以上の結果から、KU3地点にはアナモックス細菌群集が安定に維持されていることが明らかとなり、高い NO_3^- 濃度条件が維持されることがアナモックス細菌群集形成要因の一つである可能性が示唆された。

3. マイクロコスム実験における、硝酸塩添加が淡水湖堆積物中のアナモックス細菌に与える影響

アナモックス潜在活性が非常に小さかった北浦KU6地点の堆積物を高 NO_3^- 濃度条件下で培養し、アナモックス潜在活性への影響を調べた。堆積物と湖水をメスシリンダーに入れ、水層の NO_3^- 濃度をKU3地点の最大値に近い $500 \mu\text{M}$ に維持して 20°C で16週間集積し、堆積物各層のアナモックス細菌の種組成解析および脱窒潜在活性の測定を行った。集積前に $0.2 \text{ nmol-N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ であったアナモックス潜在活性は、集積後全ての層で増加し、1-2cm層では100倍近い $18.6 \text{ nmol-N}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ に増加した。アナモックス細菌の種組成解析を行った結果、集積前後で共通して検出されるグループが存在し、それらは過去に北浦KU3地点で検出されたグループと非常に近縁であった。以上の結果から、一部のアナモックス細菌が高 NO_3^- 濃度条件下で集積されたと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

世界の沿岸域・淡水域において問題となっている水質悪化を改善するには、それらの環境における窒素動態の把握が極めて重要である。近年発見された微生物代謝である嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)も、従来知られていた脱窒に加えて水圏からの窒素除去作用として機能している可能性があり、窒素動態への影響に興味をもたれる。本論文では、重要と推測されながらも知見の不足していた湖沼、河川および海洋沿岸堆積物に生息するアナモックス細菌の分布と生態学的特徴を、窒素安定同位体(^{15}N)をトレーサーとしたアナモックス潜在活性測定およびアナモックス細菌の16S rRNA遺伝子を対象としたPCR法によって明らかにした。その主な成果は下記の3点に大別できる。

- (1) [^{15}N]をトレーサーとして添加した嫌気培養実験によって、アナモックス潜在活性は湖沼(琵琶湖・霞ヶ浦北浦)、河川(淀川)および沿岸域(瀬戸内海・ベトナムのマングローブ林やエビ養殖池)堆積物に広く分布すること、またその活性は地点間で大きく異なることを明らかにした。特に、霞ヶ浦北浦の上流部ではアナモックス潜在活性が従来の脱窒潜在活性の60%に相当する地点も存在することが明らかとなった。
- (2) アナモックス細菌の16S rRNA遺伝子を選択的に増幅するPCR法を確立し、クローンライブラリー法によって上記堆積物試料中のアナモックス細菌種組成を解析した結果、生息域の塩分濃度によって、淡水域・汽水域・海域でそれぞれ異なる系統タイプのアナモックス細菌が優占している可能性を明らかにした。
- (3) 霞ヶ浦北浦における2年間のフィールド調査ならびにマイクロコスムを用いた NO_3^- 添加実験によって、底層水中の NO_3^- がアナモックス反応の基質である NO_2^- の潜在的な供給源としてアナモックス細菌分布に影響する要因の一つである可能性を明らかにした。

以上のように、本論文は窒素動態の把握が必要でありながらも知見が極めて不足していた湖沼、河川および海洋沿岸堆積物におけるアナモックス細菌の広い分布状態を明らかにし、またその生態や窒素動態への影響の一端を明らかにしたものであり、微生物生態学、陸水学、沿岸海洋学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。
なお、平成23年 2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降