

氏名(本籍)	まつ ざか えみこ 松 坂 恵美子 (東京都)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 乙 第 1982 号
学位授与年月日	平成 16 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	<i>Burkholderia cepacia</i> NH-17 における亜硝酸代謝経路の遺伝学的解析

主 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学教授	農学博士	星 野 貴 行
副 査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授	理学博士	山 根 國 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、窒素含有汚染物質による湖、沼などの閉鎖系水域の富栄養化や地下水汚染が社会問題化している。窒素汚染源の窒素除去には、硝化細菌と脱窒細菌を組み合わせた生物学的処理法が適用されている。本法の窒素除去に対する有効性は高いが十分とは言えない。すなわち用いられる独立栄養性硝化細菌は、硝化能は高いものの増殖速度が遅く、硝化工程中の菌濃度を高く維持することが困難である。また、脱窒細菌は嫌気的条件下で効率良く働くので脱窒工程を嫌気条件に保たねばならない。これらの欠点を解決するために、本研究では、増殖速度が速く、硝化と好気脱窒の両活性を併せ持つ従属栄養性細菌に着目し、その窒素代謝に関して研究を進めた。

まず、21 株の従属栄養性硝化細菌を土壌から分離し、さらに好気脱窒能を有する菌株を選抜した。また窒素安定同位体 (^{15}N - NaNO_2) を用いて好氣的脱窒能を確認し、最優良株として *Burkholderia cepacia* NH-17 を得た。

本菌株を用いて、硝化・脱窒の両活性の中間代謝物である NO_2^- を基質として、硝化・脱窒活性に対する pH の影響と NO_2^- による誘導について検討した。その結果、両活性は pH6.0 において高い活性を示し、 NO_2^- によって誘導される事を明らかにした。本特性は、一般的な脱窒細菌の活性と類似しており、硝化活性においても、同様である興味深い事実が示された。

次に、NH-17 株の亜硝酸還元酵素 (*nirS*) 遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子の破壊株と相補株を作成して硝化・脱窒活性の連動性について解析を行った。その結果、*nirS* 遺伝子破壊株は N_2O と NO_3^- をほとんど生成せず、一方、相補株においては N_2O は約 97%、 NO_3^- は約 44% の回復が認められた。この結果から、NH-17 の硝化・脱窒活性は連動していることが示唆された。

以上の結果を踏まえ、また、*E. coli* においては NO dioxygenase により NO から NO_3^- への生成が行われることより、NH-17 株において NO dioxygenase の働きを有す fhp(flavohemoglobin) 遺伝子に着目し、クローニングを行った。本遺伝子の破壊株及び相補株を用いて硝化・脱窒活性を測定した結果、NO から NO_3^- への生成に関わる経路の存在が示され、NH-17 株における NO_2^- から NO_3^- への生成は独立栄養性硝化細菌と同様な直接的な酸化反応ではなく、脱窒経路を経て行われていることを初めて示した。この成果は、微生物

の硝化、脱窒という代謝経路の明瞭な区分けにおいて多大なインパクトを与え、このような知見を基礎にして、分子育種による従属栄養性硝化細菌の機能強化を図るうえで基礎、応用面においても重要であるといえる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、窒素汚染の生物的窒素除去における問題の改善の一つとして、増殖速度が速く硝化能と好気脱窒能を併せ持つ従属栄養性硝化細菌の選抜、最適な活性を得るための条件検討、及び分子育種による機能強化を図るための基礎的知見を得ることを目的として行われた。まず、分子育種を行う上で有利な増殖速度の速い従属栄養性硝化細菌多数を自然界から単離し、さらに簡易的選抜法を組み合わせ好気脱窒能を有する優良菌を効率的に絞り込み、その活性を窒素安定同位体を使うことにより正確に確認し得た。硝化・脱窒反応の中間代謝産物である亜硝酸を基質として pH の影響や両活性の誘導実験を行い、硝化活性の生成物である NO_3^- と脱窒活性の生成物である N_2O の生成量は、脱窒細菌のそれと類似する事を見出した。これは、硝化活性と脱窒活性が連動することを示す興味深いデータである。本現象を確かなものとする為に、亜硝酸を NO へ還元する *nirS* 遺伝子のみを破壊した株及びその相補株を用いて硝化・脱窒活性を測定し、さらに、 NO を NO_3^- に硝化する *flp* 遺伝子についても同様の検討を加えて、 NO から NO_3^- への新経路の存在を示した。つまり、硝化、脱窒という明瞭な区分けで亜硝酸代謝が行われるのではなく、両代謝経路が混在する経路で行われることを初めて示した。また、新たな代謝経路が存在する可能性も示し、インパクトのある提言をしていることは大きな成果である。

以上のように、本研究は従属栄養性硝化細菌の有用な選抜方法と機能解析、またその機能に関わる遺伝子に関する新しい事実を見出し、代謝経路についても有用な基礎的知見を提供している。さらに、今後、分子育種による亜硝酸代謝機能の強化を行う上においても貴重な提案を行っており、得られた成果の役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。