

氏名(本籍)	おか だ のり ひさ 岡 田 典 久 (岡 山 県)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 乙 第 2151 号
学位授与年月日	平成 17 年 10 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	生命環境科学研究科
学位論文題目	新奇脱窒細菌の探索およびその機能解析

主 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学教授	工学博士	向 高 祐 邦
副 査	筑波大学助教授	農学博士	中 村 顕
副 査	筑波大学助教授	農学博士	杉 浦 則 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

硝酸・亜硝酸態窒素による水質汚染は環境基準超過率が高く、特に地下水における硝酸態窒素汚染は急速な広がりを見せているため、地下水浄化対策が急務である。生物脱窒法は期待されている対策法の一つであり、水系や土壤中に存在する脱窒菌を用いて硝酸イオンを窒素ガスに還元する方法である。この脱窒反応は嫌気呼吸であるため、電子供与体となる有機物が必須である。しかしながら地下水には十分な有機物は存在しないため、脱窒による水質浄化を行うためにはこれら電子供与体の添加が必要となる。実用に際して最も有効と考えられる電子供与体に、セルロースがある。これまでに、低温でセルロースを分解するが脱窒能を有さない細菌と、低温下で脱窒を行うがセルロースを利用出来ない低温性脱窒菌が取得されている。

本論文は、この低温性セルロース分解菌と低温性脱窒菌をセルロース担体に混合固定した「共生系」を構築し、脱窒反応による汚染水の浄化を目指したものである。さらに、通常の嫌氣的脱窒過程で生じる亜酸化窒素は温室効果ガスであるため、当ガスを発生しない新奇脱窒菌を得るために好気脱窒菌の検索を行った。

まず、低温性脱窒菌 NR-1 株、NR-2 株を硝酸を含む培地で 10℃にて静置培養を行いセルロース担体に固定した結果、それぞれ単独で固定した時は硝酸の減少が認められなかったが、低温性セルロース分解菌 CL-5 株と共に固定すると、培地中の硝酸態窒素の減少、および亜酸化窒素、窒素ガス生成が認められ、「共生系」の有用性が示唆された。

次いで、好気脱窒菌の探索を行った結果、好気条件下で窒素ガスを生成する NH-14 株の取得に成功したが、亜酸化窒素を生成することが明らかとなった。また生成される窒素ガスは脱窒由来ではなく、共脱窒による可能性も示唆されるなど、応用化に際しての課題点が明らかにされた。しかし、NH-14 株は非常に高い溶存酸素濃度においても脱窒を行う全く新しい現象を示したことから、酸素濃度が脱窒に与える影響を検討した。この結果、NH-14 株は好気、嫌気どちらの条件においても亜硝酸を還元して亜酸化窒素を生成した。これまでに知られている好気脱窒菌では、好気条件下においては酸素呼吸と脱窒を同時に行ったが、NH-14 株では脱窒反応の進行にも関わらず酸素濃度の変動はほとんど認められず、好気条件に関わらず酸素呼吸を停止している可能性が示唆された。また菌体の生育も同様に認められなかった。さらに、亜硝酸の消失後に酸素呼吸と菌体生育が認められた。従来、脱窒反応は酸素欠乏時のエネルギー獲得手段(呼吸)とみなされてきた

が、本菌ではこれとは異なる生理的意義を有するものと考えられる。一方で、本菌は硝酸に対しては酸素の有無に関わらず脱窒は行わず、硝酸還元能を有していないことが示された。

この新奇的な脱窒反応に関して、遺伝子レベルでの検討を加えた。この結果、亜硝酸還元酵素遺伝子に類似した配列の存在も PCR により明らかとなり、その塩基配列は *Mesorhizobium* sp. の亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) と最も高い相同性を示した。脱窒菌には 2 種類の亜硝酸還元酵素がこれまで報告されているが、本菌は銅を活性中心を持つ CuNIR タイプの酵素を有する可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

硝酸・亜硝酸態窒素による地下水汚染は深刻であるために各種の浄化研究が行われており、微生物の脱窒反応を利用した浄化法もその一つである。しかし、脱窒反応を円滑に進めるために添加すべき適切な電子供与体、及び地下水環境中でこれを分解する有用な菌が得られないために、有効な浄化法と成り得てない。本論文の著者は、電子供与体としてセルロースに着目し、また、既に単離されている低温性のセルロース分解菌及び脱窒菌を組み合わせた浄化システムについて研究を行った。その結果、両菌株をセルロース担体に混合固定することによって、硝酸態窒素の除去に成功した。さらに、本過程で発生する温室効果ガス「亜酸化窒素」の発生を制御するため、好気脱窒菌の検索を行い、NH-14 株の取得に成功した。本菌株における脱窒反応をさらに解析することにより、以下の重要な科学的知見を得ている。① NH-14 株は好気、嫌気いずれの条件においても亜硝酸を還元して亜酸化窒素を生成した。②通常の好気脱窒菌は好気条件下においては酸素呼吸と脱窒を同時に行うが、NH-14 株は脱窒反応の進行中には酸素呼吸を停止する事が示唆された。③亜硝酸の消失後に、酸素呼吸と菌体生育が認められた。④本菌は硝酸に対しては酸素の有無に関わらず脱窒は行わず、硝酸還元能を有さないことが示された。

これらの結果は、微生物を用いた地下水浄化法の構築に貢献をすると共に、細胞内での窒素代謝機構に新たな知見をもたらし、微生物生理学の分野からも高く評価出来る。

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。