

# フィンランド劣化北方泥炭地から分離した高 N<sub>2</sub>O 放出細菌株の微生物生理学的特性、脱窒関連遺伝子、ならびに化学的制御に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 阿知和 菜子

## 1. はじめに

亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) は CO<sub>2</sub> の 310 倍の温室効果を持つ比較的安定なガスであり、脱窒、硝化、あるいは硝酸塩異化的還元 (DNRA) 経路で生成される。温暖化によって永久凍土融解が起こった高緯度ツンドラ帯パルサ湿原が沈降・崩壊して形成される塩基性攪乱泥炭地は、高濃度の N<sub>2</sub>O 放出ホットスポットとして知られている。本研究は、1) 地球温暖化による攪乱を受け、N<sub>2</sub>O 放出ホットスポットとなった高緯度ツンドラ帯パルサ湿原攪乱地のミズゴケ類や劣化泥炭土壌からの高 N<sub>2</sub>O 放出細菌の探索と、それに引き続いて 2) その土壌微環境が N<sub>2</sub>O 放出細菌の応答におよぼす影響、3) ミズゴケ類や泥炭土壌環境から分離した N<sub>2</sub>O 放出細菌の脱窒関連遺伝子の探索、4) ミズゴケ類が泥炭土壌中に放出している可能性がある N<sub>2</sub>O 放出抑制物質の探索を行った。

## 2. 方法

フィンランド・キルピスヤビのパルサ湿原地盤沈降崩壊地で採取したミズゴケから組織片 1 cm 長を切り取り、5 mM KNO<sub>3</sub> 含有 Winogradsky's 無機塩-ジェランガムソフトゲル培地 (WG 培地, 10 mL) に接種した。1 週間で 1000 ppmv 以上の N<sub>2</sub>O 放出を示した培養物から高 N<sub>2</sub>O 放出細菌を探索し、得られた高 N<sub>2</sub>O 放出細菌は、それぞれ終濃度 5 mM になるよう KNO<sub>3</sub>, KNO<sub>2</sub>, あるいは (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加した WG 培地に接種し、各基質存在下での N<sub>2</sub>O 生成量を測定した。同時にアセチレン阻害試験にも供し、これら分離株の脱窒および DNRA 経路に関連する遺伝子群の検出と同定を試みた。さらに、高 N<sub>2</sub>O 放出株同士の共培養や高 N<sub>2</sub>O 放出細菌に対するミズゴケ類とその MeOH 抽出物の影響も調査した。

## 3. 結果と考察

ミズゴケ組織片を直接接種した培地からの N<sub>2</sub>O 放出検定では、6 サンプルで高濃度の N<sub>2</sub>O 放出が認められ、Peera-plot 1 の培養物からは最も活性の高い単コロニーを得たが、これは高 N<sub>2</sub>O 放出能を示すガンマプロテオバクテリア綱 *Serratia* 属とアルファプロテオバクテリア綱 *Rhizobium* 属の混合体であることが分かったため、このコロニーから両者の純粋分離を試みた。その結果、*Serratia* 属細菌 6 コロニー、*Rhizobium* 属細菌 12 コロニーの純粋分離に成功した。N 源を (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> とした場合、全ての分離細菌亜株は N<sub>2</sub>O を放出せず、KNO<sub>2</sub> 添加では KNO<sub>3</sub> 添加時よりも高い N<sub>2</sub>O 放出が認められた。従って、これら細菌亜株群は NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を効率的に N<sub>2</sub>O 生成の基質として利用できることが分かった。N<sub>2</sub>O 放出関連遺伝子については、*Serratia* 属が *narG*, *nirK*, *nrfA* を、*Rhizobium* 属が *napA*, *norB* を保持しており、両者の保有遺伝子が重複することはなかった。また、アセチレン阻害試験では両者とも N<sub>2</sub>O 放出量の増加を示さず、N<sub>2</sub>O レダクターゼが機能していないことが分かった。

N<sub>2</sub>O 放出能を喪失した *Serratia* 属細菌株 (A2 亜株) に *Rhizobium* 属ゲノム DNA を添加すると、N<sub>2</sub>O 放出が回復した。これより、*Serratia* 属細菌は *Rhizobium* 属細菌の脱窒関連遺伝子 DNA 断片 (あるいはプラスミド) を取り込み、N<sub>2</sub>O 放出経路を修復できると推察した。さらに、ミズゴケ類抽出物を添加した培地では、*Serratia* 属細菌株 (A1 亜株) で N<sub>2</sub>O 放出が強く抑制されたが、*Rhizobium* 属細菌株 (B10 亜株) に対する N<sub>2</sub>O 産生抑制効果は認められなかった。これらの現象は、*Serratia* 属細菌亜株間で特に顕著な、N<sub>2</sub>O 放出の不安定性要因を知る足がかりになると考えられた。