

学位論文内容の要旨

報告番号	先端科学技術甲第 165 号	氏名	小西 智之
論文題目	コマツナ栽培土壌の微生物叢解析及びそれより単離した新種微生物 skT53 株の特性		

70 億人を超えて急増する世界人口と途上国の経済発展によって食糧需要の拡大は続いている。それらを賄うには農業技術の進歩が欠かせない。これまでは、緑の革命に象徴されるように、近代農業は多量の化学肥料や化学農薬の使用、栽培体系に適した作物の品種改良により、高い生産性を達成してきた。しかし、こうした近代農業は物質循環や生物多様性に歪みをきたし、農業の持続性において問題があると指摘されている。持続可能な農業の技術として微生物の分野が注目されている。農作物と微生物の相互作用に関する研究開発と農業への適用は 19 世紀半ばの植物病原菌研究にはじまり、20 世紀前半にかけては根粒菌や菌根菌に代表される、植物に有用な微生物の基礎研究が行われてきた。1950 年代以降、有用な微生物の研究は実用段階に入り、微生物を用いた生物農薬や微生物資材の販売が行われてきた。微生物農薬は自然界に存在しているものが多く、これを活用した植物病害の防除は、化学農薬で近年問題となっている、薬剤耐性病原菌の出現や農薬自体の残留等を解決するための有力な手段として注目されている。また微生物資材は連作障害の防止や作物の生産性や品質向上などで注目されている。このように、微生物研究は農業技術の進歩に極めて重要である。

本研究では、まず足立区内の協力農家の畑から採取した土壌中の微生物叢の解析と栄養素の測定から、コマツナ栽培土壌で発生した生育不良の微生物叢と土壌中栄養素の関係及び土壌消毒が微生物叢に与える影響の調査結果をまとめた。さらに土壌からの微生物の単離を行い、作物の生育へ影響を与える有用な微生物の発見に至った経緯を述べる。

研究の結果、コマツナ栽培土壌で発生した生育不良は、土壌中の窒素循環に関わる微生物が少ないことによる窒素不足に起因して発生した可能性が示唆された。また生育不良土壌をくん蒸剤を用いて土壌消毒を行った後、作物の生育が回復していたことから、土壌消毒後も生き残った微生物が作物の生育に影響を与えているという仮説を立て、コマツナ栽培土壌からの微生物の単離を行った。単離した微生物の特性を解析した結果、単離株は *Effusibacillus* 属の新種であると明らかになり、*E. dendaii* と命名した。この取得した新規微生物は亜硝酸酸化還元酵素、硝酸酸化還元酵素、同化的硝酸還元酵素と酸性フォスファターゼの遺伝子を有しているということが判明した。この微生物が植物に与える影響を調べるためコマツナでの生育試験を行った。その結果、この微生物を接種した土壌でコマツナの葉数、長さ、幅、茎長、乾燥重量で平均値が高いことから作物へ良い影響を与えている可能性が示唆された。

本論文は、5章構成となっている。

第1章では、本研究の背景として植物の生育に関係する栄養素や土壌中に存在する植物に影響を与える微生物の役割について述べている。また、分子系統解析に基づく微生物分類や細菌の同定で用いられる形態学的な特徴の観察、生理・生化学的性状の試験、細胞成分の化学分析や遺伝子の解析について述べている。

第2章では、土壌中の微生物叢の解析と栄養素の測定から微生物叢と土壌中栄養素の関係について述べている。微生物叢解析は、畑土壌から採取したサンプルより抽出したDNAを鋳型にし、PCRで増幅した16S rRNA遺伝子のV4領域の塩基配列を次世代シーケンサを用いて決定し、その配列を用いて行った。その結果、1667種の微生物が同定され、さらに作物生育環境と微生物属の相対的な割合の増減との相関に関する知見が得られた。栄養素の測定からは、コマツナ栽培土壌で発生した生育不良では硝酸態窒素が少ないこと、窒素循環に関わる微生物が少ないことが明らかとなった。このことから窒素循環に関わる微生物が少ないことで硝酸態窒素が不足し生育不良が起きた可能性が示唆された。

第3章では、コマツナ栽培土壌からの微生物の単離について述べている。生育不良土壌をくん蒸剤を用いて土壌消毒を行った後に作物の生育が回復したという現象の原因の一つとして、作物の生育に対する微生物の未知の影響があるとの仮説に基づき単離を試みた。具体的には、9つの候補株を取得して16S rRNA遺伝子をPCR法により増幅し塩基配列し、その塩基配列と類似性の高い配列をNCBIのデータベースを用いて検索した。得られた結果の中から、土壌消毒後の土壌で生育不良土壌より高くなっていった微生物種に属するものと同定された候補株、N39とN53に注目した。N39株はその後の培養が上手くいかなかったため調査を諦め、N53株を改めてskT53株と名付け調査を進めた。

第4章では、前章で取得したskT53株についての特性について述べている。取得したskT53株の分子系統解析に基づく分類と形態学的な特徴の観察、生理・生化学的性状の試験、細胞成分の化学分析や遺伝子の解析による分類・同定及び全ゲノム配列の解析を行った。分子系統樹の作成は近隣結合法、最大節約法、最尤法を用いて行った。分子系統樹に加えANI値及びdDDH値、形態学的な特徴及び生理・生化学的性状からskT53株はAlicyclobacillaceae科のEffusibacillus属の新種と判断された。またskT53株は、亜硝酸酸化還元酵素、硝酸酸化還元酵素、同化的硝酸還元酵素と酸性フォスファターゼの遺伝子を有しているということが判明した。skT53株が植物に与える影響を調べるためにコマツナ生育試験を行い測定した結果、skT53株を接種した土壌でコマツナの葉数、長さ、幅、莖長、乾燥重量の平均値において未接種条件より高い傾向が認められた。

第5章では、本研究の総括について述べている。skT53株はEffusibacillus属の新種であることが明らかになり、*E. dendaii*と命名した。