

根粒菌生態機能を活用した 環境保全型ダイズ生産技術の開発に向けて

国立大学法人 宮崎大学 農学部

教 授 佐 伯 雄 一

ダイズ生産の現状

ダイズは、味噌、醤油、豆腐、納豆など、日本の食生活には欠かせない重要な作物です。また、ダイズは種子中に7%もの窒素を蓄え、「畑のお肉」とも呼ばれるタンパク質含量の高い作物です。人間の体内で作り出すことの出来ない必須アミノ酸を含む20種すべてのアミノ酸を含み、栄養バランス面からも大きな役割を担っています。平成25年には、ユネスコ無形文化遺産に「日本人の伝統的な食文化」が登録され、大豆食品を含む日本の食文化が世界から注目されています。近年、中国がダイズの輸入大国に変化し、また、バイオディーゼル燃料の油脂原料として注目されていることもあり、世界中での需要の高まりが国際取引価格の高騰を引き起こしています。このような世界的な需要変化が起きている中、消費されるダイズの90%以上を輸入に依存している日本においては、国内自給率を上げるためにダイズの増産、安定供給が求められているのは当然のことと言えます。農林水産省では、平成32年までに品目別自給率で17%に上昇させる目標を掲げています。

現在、日本の単位面積当たりのダイズ収量は全国平均で155kg/10a（平成25年）程度に過ぎません。ダイズ収量を300kg/10a得ようとする窒素25kgが必要とされています。ところが、ダイズはその生育に多量の窒素を必要とするにも関わらず、施肥窒素への反応性は低く、施肥による生育制御が難しい作物とされています。現在のところ、ダイズ生産性確保のためには、地力窒素の向上と土壤水分管理が重要とされています。一方、ダイズへの窒素供給量を肥料によって人為的にコントロールすることが難しい反面、共生根粒菌による共生窒素固定能を発揮させることによってダイズの窒素要求に適應した窒素供給が可能で

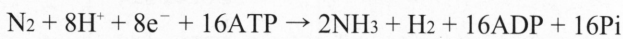
す。ダイズと根粒菌の共生窒素固定は好適条件下では30kg/10a以上の窒素を大気から固定して宿主ダイズに供給することが出来ます。このため、地力の向上と共に、根粒菌機能を如何に引き出すかがダイズ安定多収化の鍵と言えます。現在まで、窒素固定能の高い根粒菌が選抜され、微生物資材として人工増殖した根粒菌をダイズ種子に接種し、栽培することで収量増加が図られてきました。しかし、接種効果が判然としない場合が多く、有意に収量を増加させる農業技術として確立していないのが現状です。これは、接種した有用根粒菌がダイズに感染する前に、土壤に適應した窒素固定能の低い土着根粒菌が感染するため、ダイズ栽培歴のない根粒菌密度の低い土壤以外では、土着根粒菌との競合で根粒占有率を確保できないためです。したがって、根粒菌の土壤中における土着化・優占化や根粒菌株間の競合感染メカニズムなど、生理・生態学的知見を蓄積し、根粒菌生態を明らかにした上での技術開発が望まれています。

本稿では、ダイズ根粒菌の多様性、地理的分布と根粒菌群集の変遷、および土壤中での根粒菌占有率に及ぼす脱窒能の影響について、これまで得られたデータを抜粋整理して、考察してみたいと思います。

根粒菌の共生窒素固定能と脱窒能

窒素は大気中に N_2 ガスの状態で大量に存在しています。しかしながら、動物や植物は N_2 を直接利用することは出来ません。植物にとって窒素は、生体内でアミノ酸や核酸を構成する重要な元素であり、炭素、酸素、水素に次いで含有量の多い元素です。炭素、水素、酸素は、水や二酸化炭素、酸素から獲得できますが、窒素・リン・カリウム・カルシウムなど多くの元素は根からの吸収に限定されます。特に窒素は自然環境中で制限因子と

なりやすく、植物は、進化の過程で窒素獲得能力や窒素利用効率を高めて来ました。なかでもマメ科植物は、大気中のN₂をアンモニアに還元する生物的窒素固定能を有する窒素固定細菌と共生関係を結ぶ能力を獲得したことによって、間接的に大気窒素を利用する能力を獲得し、窒素不足からほぼ解放されたといえます。窒素固定細菌は、大雑把に、単独で窒素固定を行う単生窒素固定菌と、植物との共生によって窒素固定を行う共生窒素固定菌に分類されます。これらの生物的窒素固定反応はニトロゲナーゼと呼ばれる酵素が行っていて、以下の窒素固定反応を触媒しています。



ニトロゲナーゼは酸素感受性が高く、酸素分圧が高いと失活してしまいます。マメ科と根粒菌の共生窒素固定では、植物は根粒菌が作るニトロゲナーゼを失活させないように、ヘモグロビン（レグヘモグロビンと呼ばれる）を合成し、感染細胞内の酸素分圧を下げることによって、ニトロゲ

ナーゼの活性を落とさないようにしながら、自身の細胞や感染根粒菌に酸素を供給しています。

一方で、ダイズ根粒菌はその窒素代謝の過程において、脱窒能を示すことが知られています（図1）。脱窒は嫌気呼吸の一つで、水田土壌や常に土壌水が保持されている微細土壌粒子間隙のような嫌氣的（完全嫌氣的ではなく微好氣的環境）条件下で硝酸イオンを順次還元し、窒素ガスを最終生産物とします。しかし、脱窒関連酵素群の中で、亜酸化窒素（N₂O）を窒素（N₂）に還元する酵素を持たない微生物も多く、その場合、二酸化炭素のおよそ300倍の温室効果を示すN₂Oが大気中に放出されることとなります。ダイズ根粒菌の脱窒能は*Bradyrhizobium*属根粒菌についてよく調べられていて、図2に示したように、同じ*Bradyrhizobium*属根粒菌でもその脱窒能が異なることが分かっています（Sameshima-Saito *et al.* 2006）。また、不完全脱窒能を有する根粒菌が優占するダイズ栽培圃場からのN₂Oの発生が報告さ

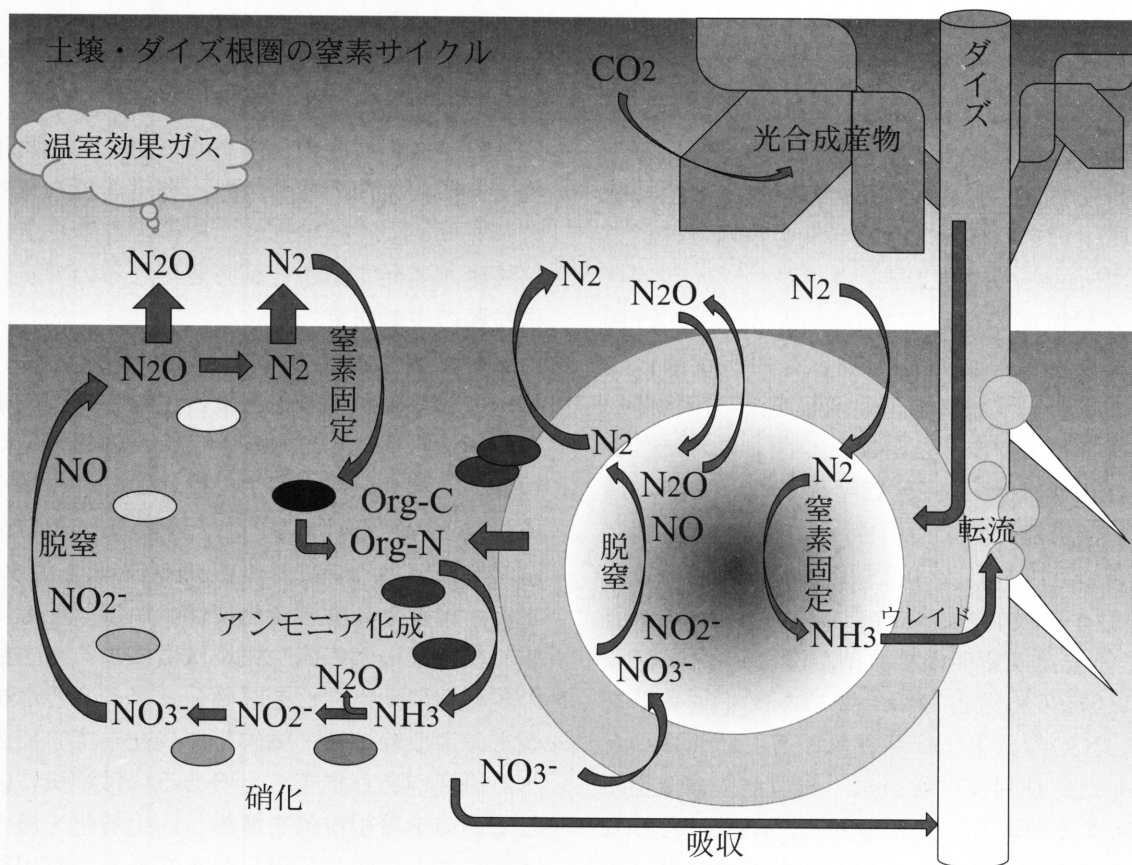


図1. 土壌・ダイズ根圏を廻る窒素サイクル

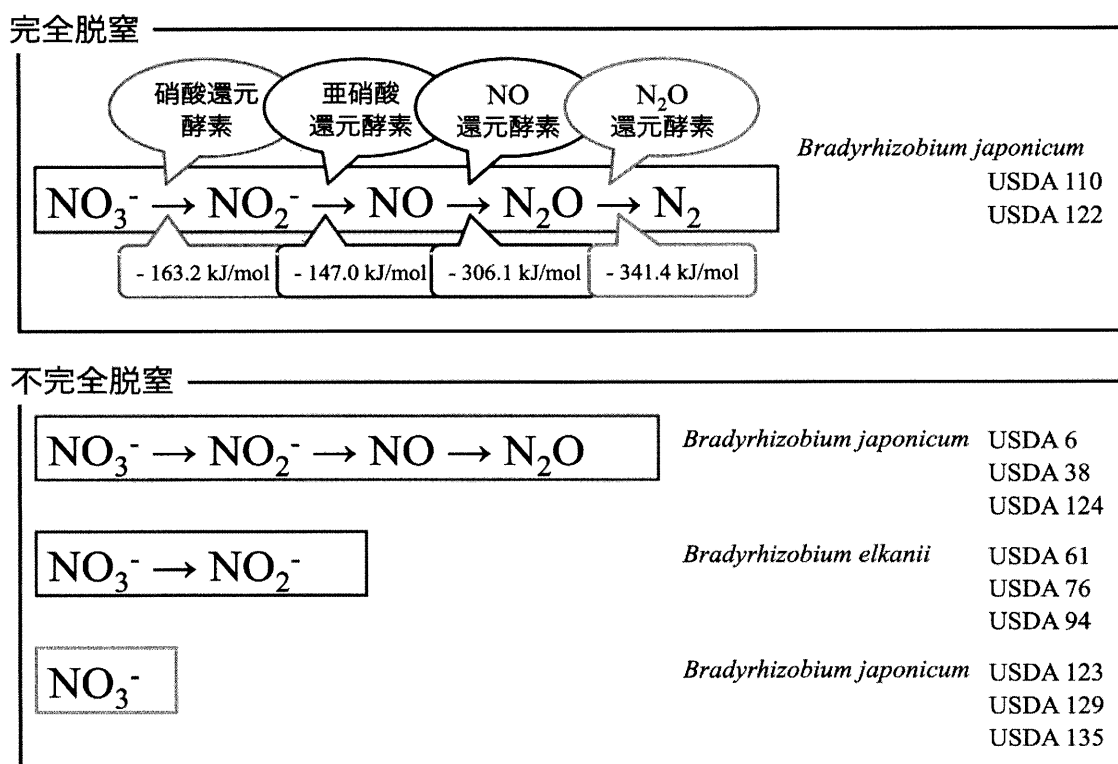


図2. ダイズ根粒菌の脱窒活性 (佐伯・城2013)

れており、現在、環境保全型ダイズ栽培の課題となっています (金ら 2005)。この事実、ダイズ根粒内での窒素代謝に脱窒過程を含んでいることを示しており、研究の結果、感染ダイズ根粒菌と根圏に生息する様々な生物の関与が示唆されています (Inaba et al. 2012)。

ダイズ根粒菌のなかで*B. japonicum* USDA110株は古くから窒素固定能の高い有用根粒菌として認識されており、ダイズの増収を図る接種菌として期待されてきました。また、図2に示したように、USDA110株は完全脱窒能を有します。最近、根粒菌機能をうまく引き出して高い窒素固定能を発揮させつつ、ダイズ根圏からのN₂Oの揮散を抑制する方法が報告されました (Itakura et al. 2013)。不完全脱窒能の根粒菌が優占する圃場で、USDA110株の根粒占有率を高めたダイズ栽培を行うと、N₂Oの発生が抑制されることが明らかとなりました。注目すべき点は、根粒が土壤気相のN₂Oガスまでも取り込んで還元し、N₂ガスとして放出する点です。このように、根粒菌には高い共生窒素固定能と完全脱窒能を有する株が存在し、

これらの特性を利用することで、環境保全型ダイズ栽培が可能になると期待されます。そのためには、ダイズ根粒菌の生態を明らかにし、共生微生物である根粒菌のなかでも、有用形質を有する根粒菌を効率よく感染させ、根粒占有率を上げる栽培技術を開発することが必要になるのです。

根粒菌の生態研究

ダイズの生産現場に目を向けると、土壤には、特定の根粒菌が土着化・優占化してダイズ根粒菌群集構造を形成しており、これらの根粒菌はその地域の土壤や気候、宿主に適応して群集構造を形成したと考えられます。したがって、根粒菌の生態学的研究の一つに、土壤pHやEC値、湛水状態、また、緯度や高度の変化に伴う温度(地温)に対する根粒菌の適応能や環境傾度による宿主植物への親和性の変化などを評価し、どのような根粒菌がどのような地域・気候帯に局在しているのか調べる研究があります。土壤あるいは地域に優占化している土着根粒菌を解析し、土着化・優占化のメカニズムに関して得られた知見を、有用根粒菌を利用した農業技術に応用することが期待される

わけです。宿主植物や根粒菌のゲノム情報の蓄積と分子生態学的研究手法の発達に伴い、宿主の多様性や多様な土壌生物をも含む様々な環境因子下における根粒菌生態に関する知見も蓄積されてきています。

ダイズ根粒菌種には、新規の種が報告されてきていますが、主なもので、*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Ensifer/Sinorhizobium fredii* が知られています。これまでの報告から、アルカリ性土壌には*S. fredii*が局在しており、弱酸性から中性土壌には*Bradyrhizobium*属根粒菌が優占しているのは世界的に共通の現象と考えられます。

また、*B. japonicum*は温帯系のダイズ根粒菌、*B. elkanii*は亜熱帯・熱帯系のダイズ根粒菌と言えそうです

(Saeki *et al.* 2006; Saeki *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2008; Adhikari *et al.*

2012; Shiro *et al.* 2012; Saeki *et al.* 2013)。

根粒菌生態を研究するためには、根粒菌を分類する指標が必要であり、現在ではDNA多型を利用した分類法が主流となっています。原核微生物の分類指標として最も多く利用されるのは16S rRNA遺伝子の配列で、保存性が高く同属同種で

配列の違いが小さいため、異なる属種の微生物を比較分類・同定するのに有用です。一方で、ダイズ根粒菌のように限定された微生物種の種内多様性を評価するためには、より多型に富んだ領域をターゲットとして解析する必要があります。近年では比較的多様性に富むハウスキーピング遺伝子などが注目されています。その中でも古くから利用されてきたのが、16S-23S rRNA遺伝子 internal transcribed spacer (ITS) 領域で、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子との間に存在する介在配列で、*Bradyrhizobium*属根粒菌では、イソロイシンとアラニンのtRNA配列が含まれています (図3)。

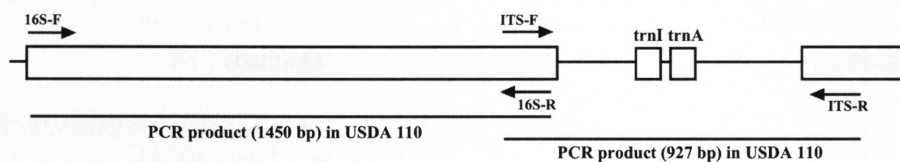


図3. ダイズ根粒菌解析のためのターゲット領域

私たちの研究室では、*Bradyrhizobium*属根粒菌ITS領域の基準菌株として11菌株を選抜・使用しています (Saeki *et al.* 2004)。これらの基準菌株との比較で、日本とアメリカの土着ダイズ根粒菌の分布と多様性に関するITS領域の解析の結果、図4に示す結果が得られました。両国のダイズ根

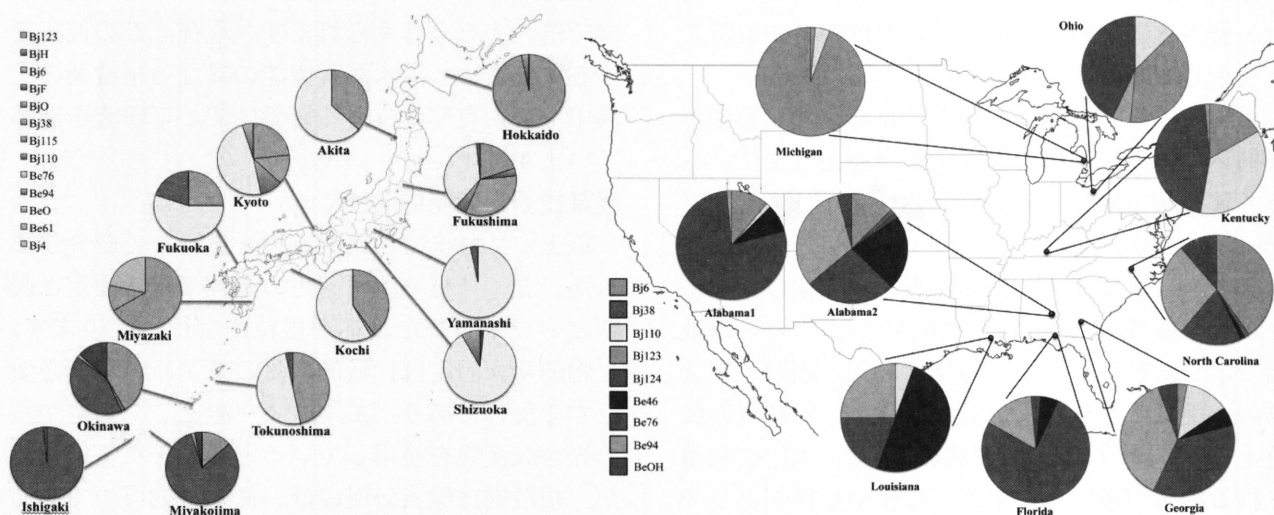


図4. 日本とアメリカの土着ダイズ根粒菌の群集構造と地理的分布 (Saeki *et al.* 2013, Shiro *et al.* 2013より作図)

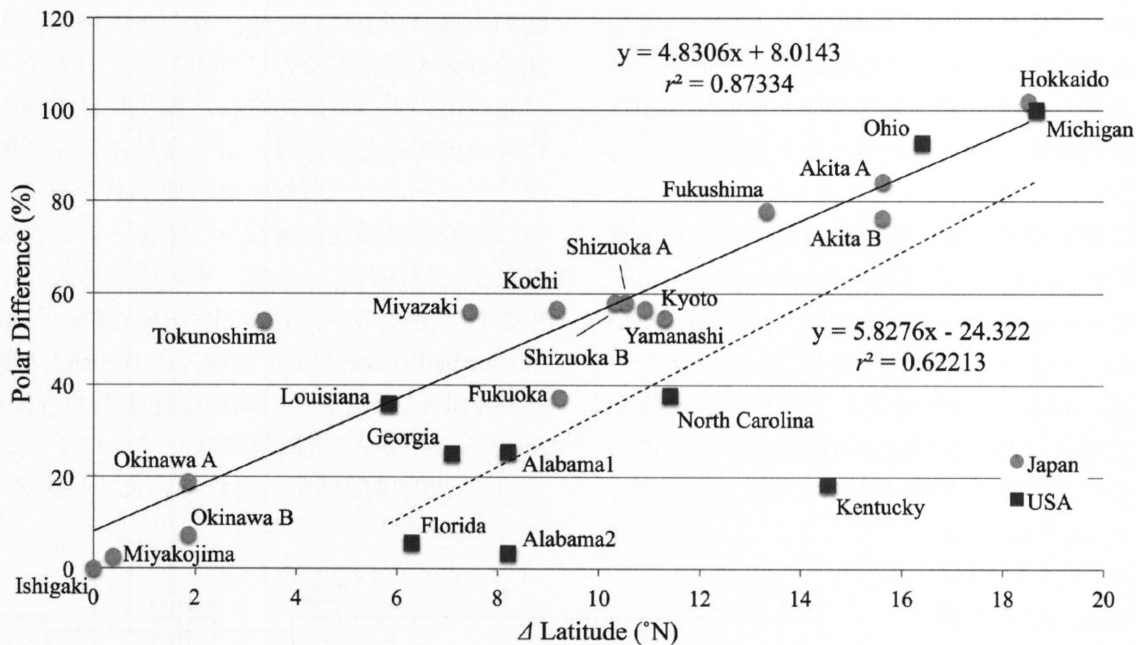


図5. 緯度によるダイズ根粒菌群集構造の分布
(Saeki and Shiro 2014)

粒菌の分布を比較してみると、図5の結果が得られます。アメリカの根粒菌分布は日本と比較して南寄りに偏っているものの、北部でBj123クラスター、温暖な地域でBj6やBj110クラスター、亜熱帯地域でBeクラスターに属する根粒菌が優占している点で共通であると言えます。日本とアメリカの経度は、ほぼ地球の反対であるにもかかわらず、類似した緯度でダイズ根粒菌群集構造の変遷が似ているという事実は、ダイズ根粒菌の土着化・優占化に関わる環境因子に温度が含まれることを示しています。

さらに、日本の根粒菌分布を見ると、根粒菌群集構造の緯度に沿ったニッチの変遷とは別に、シルト質土壌では*B. japonicum* USDA110株のクラスター（Bj110クラスター：図4に示した黄色のクラスター）に属する菌株の占有率が非常に高いことが判ります（Saeki *et al.* 2013）。図4の日本地図で示した秋田、山梨、静岡、高知、福岡、徳之島の土壌は、グライ土、灰色低地土、細粒質赤黄色土です。グライ土・灰色低地土は、水田に利用される場合が多いのですが、輪作や転換畑としてダイズや麦が作られる場合も多く、Bj110クラスターの優占が各地で検出されます。その理由とし

て以下のことが考えられます。細粒質土壌など、保水力が強く還元的になりやすい土壌では、微生物は酸素の少ない環境に晒されることとなります。したがって、呼吸は嫌気呼吸になり、微好気的環境下で生残性の高い微生物が優占すると考えられます。N₂OをN₂に還元する完全脱窒能を有する根粒菌は、N₂Oまでの不完全脱窒能の根粒菌に比べて、脱窒によるエネルギー獲得効率が高く（Thauer *et al.* 1977）、酸素が制限された環境の土壌で優占すると考えられます。現在、この仮説を検証するため、湛水が脱窒能の異なる根粒菌の土壌中での占有率に与える影響に関して研究を進めています。

農業技術の開発に向けて

以上、これまでの研究成果を抜粋して紹介しました。ダイズ根粒菌は共生の過程で窒素固定と脱窒という矛盾した反応を根粒内で行っています。生物的窒素固定は比較的多量のエネルギーを必要とする反応であり、エネルギー源として宿主からの光合成産物を使用していると考えられています。根粒内は酸素分圧の低い微好気的環境であるため、脱窒関連遺伝子群が発現し、脱窒によっても窒素固定のためのエネルギーを獲得しているの

かもしれません。地球全体から発生するN₂Oのうち、約4割が人間活動に伴う人為的発生であると言われています。そのうち農耕地からのN₂Oの発生は人為的発生量のおよそ40%を占めるとされています。土壌における窒素の形態変化において、N₂Oはアンモニアの硝化に伴う過程でも、硝酸の脱窒に伴う過程でも発生する中間産物であるので、発生を完全に抑制することは難しいとされていますが、可能な限り人為的発生の削減が望まれます。ダイズ栽培において、根粒菌群集構造のコントロールが可能になれば、N₂O削減のための栽培技術の一つになり、有用根粒菌は、高窒素固定能とN₂Oガス発生抑制能を示し、一石二鳥の微生物資材として活用が期待されます。

根粒菌生態研究の結果、根粒菌の生態学的特性を利用し、有用根粒菌の根粒占有率を人為的にコントロール出来る可能性が拓けてきました。研究のさらなる展開によって、遺伝子組換え体ではなく、実在の根粒菌の生態を利用し、フィールドにおける有用根粒菌の根粒占有率を上げ得る環境保全型持続的ダイズ栽培技術の開発が期待されます。

文 献

- Adhikari *et al.* (2012) *Plant Soil*. 357 : 131-145.
Inaba *et al.* (2009) *Microbes Environ.* 24 : 64-67.
Itakura *et al.* (2013) *Nature Climate Change*. 3 : 208-212.
金榮厚ら (2005) 日作紀. 74 : 427-430.
Saeki *et al.* (2006) *Soil Sci. Plant Nutr.* 52 : 418-426.
Saeki *et al.* (2005) *Soil Sci. Plant Nutr.* 51 : 1043-1052.
Saeki *et al.* (2013) *Microbes Environ.* 28 : 470-478.
佐伯・城 (2013) 生物の科学 遺伝. 7 : 557-561.
Saeki and Shiro. (2014) *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. 195-223.
Sameshima-Saito *et al.* (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 74 : 2526-2532.
Shiro *et al.* (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78 : 1243-1250.
Suzuki *et al.* (2008) *Soil Sci. Plant Nutr.* 54 : 237-246.
Thauer *et al.* (1977) *Bacteriol. Rev.* 41 : 100-180.