

- 1) E. Block, R. E. Penn & L. K. Revelle: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2200 (1979).
 - 2) W. M. Randle, J. E. Lancaster, M. L. Shaw, K. H. Sutton, R. L. Hay & M. L. Bussard: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **120**, 1075 (1995).
 - 3) C. C. Eady, L. Truman, J. McCallum, M. Shaw, M. Pither-Joyce, S. Davis & J. Reader: *Acta Hort.*, **688**, 181 (2005).
 - 4) S. Imai, N. Tsuge, M. Tomotake, Y. Nagatome, H. Sawada, T. Nagata & H. Kumagai: *Nature*, **419**, 685 (2002).
 - 5) G. R. Davuluri *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **23**, 890 (2005).
 - 6) G. Sunilkumar, L. M. Campbell, L. Puckhaber, R. D. Stipanovic & K. S. Rathore: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18054 (2006).
 - 7) H. W. Dodo, K. N. Konan, F. C. Chen, M. Egnin & O. M. Viquez: *Plant Biotechnol. J.*, **6**, 135 (2008).
 - 8) C. C. Eady, T. Kamoi, M. Kato, N. G. Porter, S. Davis, M. Shaw, A. Kamoi & S. Imai: *Plant Physiol.*, **147**, 2096 (2008).
- (鴨井享宏, ハウス食品(株)ソマテックセンター)

日本国内におけるダイズ根粒菌の分布と多様性 共生窒素固定の農業技術としての有効利用を目指して

マメ科植物と根粒菌の共生系に関する研究は、多くの研究者による長い歴史を有し、植物と微生物の共生関係確立の生理生化学的・遺伝進化的知見を充実させる重要な研究材料となっている。近年では、マメ科モデル植物のミヤコグサとミヤコグサ根粒菌のゲノム研究が進展し、農業上重要な作物であるダイズへの発展的研究が行なわれるようになってきた。このように、マメ科植物と根粒菌のゲノムサイエンスは発展していく一方で、生産現場に目を向けてみると、窒素固定能の高い根粒菌の有効利用による農業技術確立の道程はまだまだ遠いようである。マメ科作物の中でもダイズは世界的に栽培される需要の高い作物であり、日本においても食文化の主要な役割を担う作物である。それにもかかわらず、ダイズの国内自給率はわずか5%、食用ダイズでも20%にすぎない。この自給率の低さはダイズの安定多収の困難さが原因の一つであるが、輸入大豆の価格高騰に伴い、国内自給率を高めることの重要性が認識されるようになった。

ダイズの安定多収生産を可能にするためには、地力の向上を図るなど、有効な栽培技術を確立することが重要である。期待されている栽培技術開発の一つに、高窒素固定能を有する有用根粒菌の接種による根粒占有率を確保する栽培技術が挙げられる。しかし、生産現場においては、特定の根粒菌が土着化・優占化しており、これらの根粒菌はその地域の土壌や気候、宿主に適応して土壌中での占有率を高め得たと考えられ、多くの場合、播種時の種子に有用根粒菌を接種しても、土着根粒菌との競合で接種根粒菌の根粒占有率を上げることは困難とされている。この課題を克服するための取り組みの一つとして、当該土壌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応用することが考えられる。現在のところ、根粒菌生態に関する知見は充分とは言い難く、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の解析はこれからの課題となっている。ここでは、日本国内に土着化しているダイズ根粒菌の地理的分布と多様性および群集構造解析に関する研究例を紹介する。

各地に分布しているダイズ根粒菌の解析においてこれまで多くの研究がなされており、その基準となる菌株には窒素固定能が高く有用根粒菌とされている *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 株をはじめとして、数株の主要な根粒菌が用いられてきた。ダイズ根粒菌は *B. japonicum*, *B. elkanii*, *Sinorhizobium fredii* の2属3種が知られている（ここでは *B. liaoningense* を *B. japonicum* に含む）。特に国内には *Bradyrhizobium* 属根粒菌が主に分布しているが、血清型標準菌株と呼ばれる株だけで16株あり⁽¹⁾、抗血清と凝集反応を示さない土着根粒菌も多数検出されているため、数株の参照菌株での分類では不十分な場合が多い。根粒菌の16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域は、16S rRNA 遺伝子と比較すると多様性に富む配列である。そこで、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌のITS領域をPCR増幅し、制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) から系統樹を作成し、クラスター解析によって得られた結果をもとに、*Bradyrhizobium* 属の血清型標準菌株からITS多型解析の基準菌株として11菌株 (*B. japonicum* USDA 4, 6^T, 38, 110, 115, 123, 124, 135, *B. elkanii* USDA 46, 76^T, 94) が選抜された⁽²⁾。

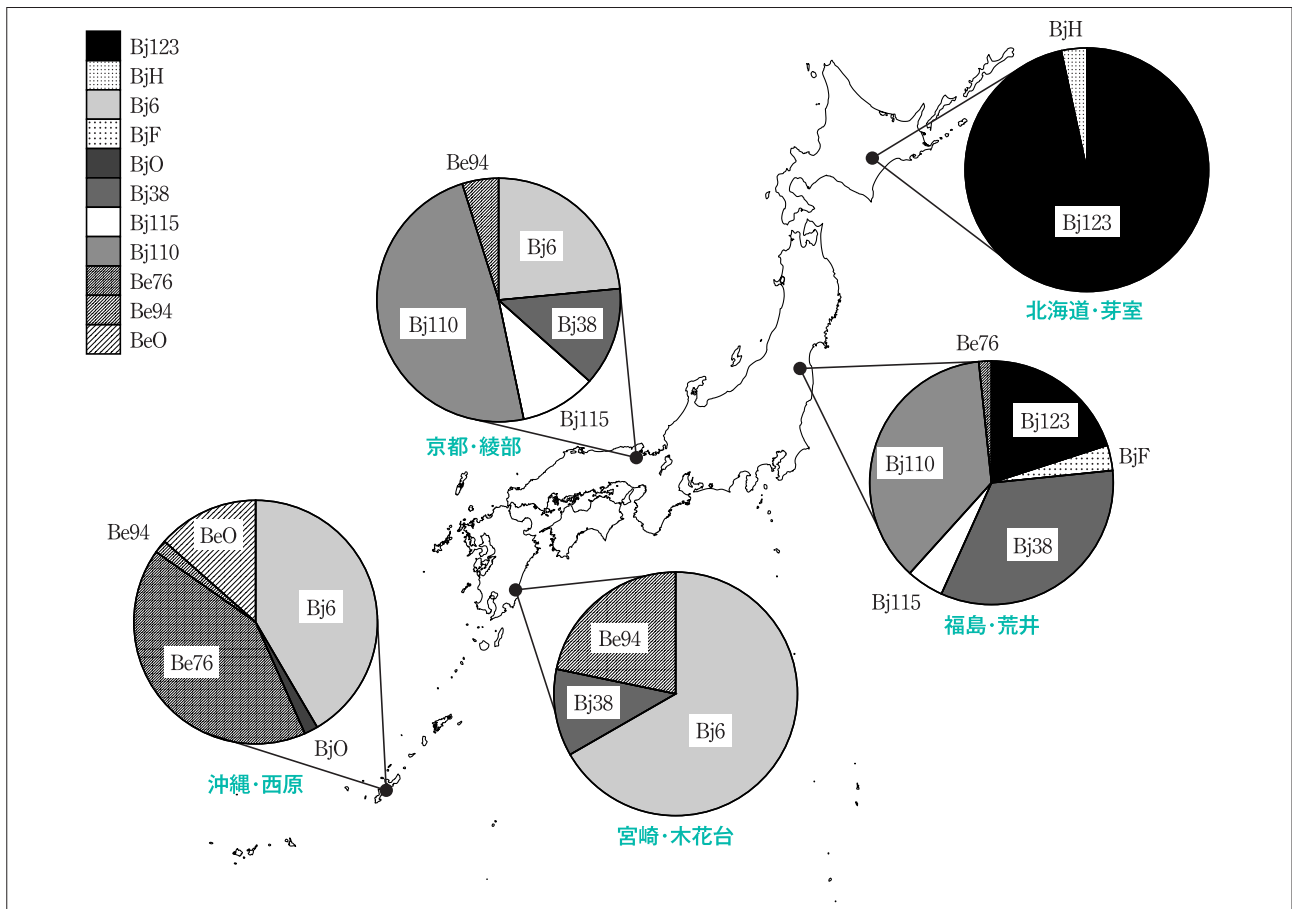


図1 ■ 日本における *Bradyrhizobium* 属土着ダイズ根粒菌の地理的分布と多様性

日本のダイズ根粒菌は11のクラスターに分類される根粒菌が土着化しており、主としてBj6, 38, 110, 115, 123 および Be76, 94 の7種のクラスターに分類される根粒菌の占有率が高く、その分布は北から南へニッチの変遷を示す。

これらの基準菌株との比較で、日本国内の土着ダイズ根粒菌の分布と多様性に関する解析が行なわれた。国内5地点の弱酸性土壤に生息する土着ダイズ根粒菌を、*Rj* (後述) 遺伝子型の異なるダイズ品種、アキシロメ (non-*Rj*)、CNS (*Rj₂Rj₃*)、フクユタカ (*Rj₄*) の3タイプの遺伝子型品種に着生した根粒から分離し、ITS領域の解析を行なった例では、日本においては主に7つのクラスター (Bj6, 38, 110, 115, 123 および Be76, 94) に分類される根粒菌が土着化していることが示された (図1)^(3,4)。さらに、その分布は、北から南へ、特定のクラスターに属する土着ダイズ根粒菌の生態的地位 (ニッチ) の変遷を示し、さらに、環境傾度による群集構造の差異を直線上に投影する解析手法である極座標付けによって評価してみると、それぞれの宿主から分離された根粒菌の群集構造は、緯度に沿って変遷していることが明らかとなった

(図2)⁽⁴⁾。この結果は、ダイズ根粒菌の土着化・優占化に関わる環境因子に温度や地理的環境の変遷に伴う宿主の多様性が含まれることを示唆している。さらに、土壌pHがダイズ根粒菌フローラに及ぼす影響を検証するため、同一圃場で酸性・アルカリ性の両土壤を有する琉球大学圃場の酸性土壤およびアルカリ性土壤に土着化しているダイズ根粒菌の解析を行なった結果、酸性土壤には *B. elkanii* を主とした *Bradyrhizobium* 属根粒菌、アルカリ性土壤には *S. fredii* 根粒菌が優占し、それぞれまったく異なるダイズ根粒菌フローラを形成していることが明らかとなった⁽⁵⁾。これらの結果から、同一地域であっても土壌pHの違いが根粒菌フローラに大きな影響を与えていることが示唆された。

ダイズには *Rj* 遺伝子と呼ばれる根粒形成調節遺伝子を保有する品種が存在し、*Rj* 遺伝子保有ダイズは特定

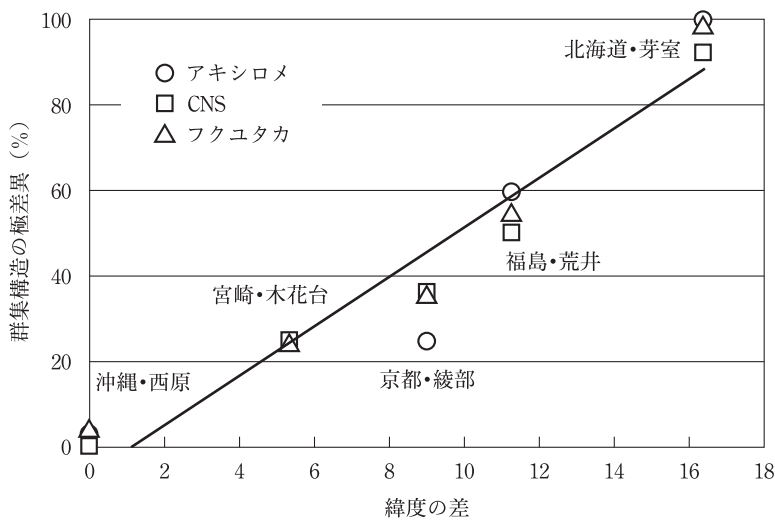


図2 ■ 根粒菌群集構造の極座標付けと分離土壌の緯度との関係

ダイズに着生した根粒菌を一つの群集として捉え、数理生態学的解析を行ない、それらの群集構造の極座標を求めると、各地から分離された根粒菌群集は緯度に沿った分布を示す。

の根粒菌の根粒着生を抑制することが知られている⁽⁶⁾。したがって、根粒菌の分布と多様性の解析には地理的な分布と多様性に加えて、宿主遺伝子型による感染根粒菌の群集構造の差異を捉える必要がある。前述のように *Rj* 遺伝子型が異なるダイズを用いて根粒菌を分離し、遺伝子型毎にその群集構造の数理生態学的解析を行なうと、分離土壌が同一であっても、宿主の遺伝子型によって感染している根粒菌群集に差異が認められる場合がある⁽⁴⁾。この理由の一つとして、土着根粒菌の中に、特定の *Rj* 遺伝子型に対する非親和性株が存在する可能性が挙げられる。加えて、たとえば無菌的に播種したダイズに分離株を単独接種して栽培した場合には同じような根粒着生を示すにもかかわらず、混合接種した場合には一方の根粒菌が優占することが多く認められる。同じことがダイズ栽培圃場でも起こっていると考えられ、このことは根粒形成調節遺伝子である *Rj* 遺伝子もしくは根粒着生に関連する形質が根粒菌の根粒着生における競合力の差異に影響を及ぼしている可能性を示唆している。このような形質の解析は、土着根粒菌の感染を抑制し、接種根粒菌の根粒占有率を上げ得るダイズ育種へつながっていくと考えられる。

以上の結果は、ダイズ根粒菌の土着化・優占化が、温度(地温)や宿主植物の形質および土壌 pH に対応していることを示唆している。しかし、ここまでの話題が、栽培ダイズに着生した根粒から分離した根粒菌の解析を行なうことによって得られた結果をもとに展開してきた

ことを忘れてはならない。上記のように、土壌中に生息している根粒菌の群集構造とダイズに感染する根粒菌の群集構造が一致しているとは考えにくく、有用根粒菌を利用した農業技術の開発のためには、土着根粒菌の群集構造と様々なダイズ品種への感染根粒菌の群集構造を比較評価すると同時に、接種根粒菌の生態を解明していくことが重要である。さらに、土壌は複雑な環境因子の集合体であるため、なお多くの環境因子の根粒菌生態に及ぼす影響を評価することが必要である。将来的には環境傾度に対する根粒菌の応答を予測するための生態モデルを構築することによって、多様な生産現場に応じた柔軟性のある有用根粒菌の利用技術に発展していくとともに、作物生産性確保や環境・生態保全を実現する生物指標として応用されていくことが期待される。

- 1) P. van Berkum & J.J. Fuhrmann: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 2165 (2000).
- 2) Y. Saeki, N. Aimi, M. Hashimoto, S. Tsukamoto, A. Kaneko, N. Yoshida, Y. Nagatomo & S. Akao: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 517 (2004).
- 3) Y. Saeki, N. Aimi, S. Tsukamoto, T. Yamakawa, Y. Nagatomo & S. Akao: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 418 (2006).
- 4) Y. Saeki, M. Minami, A. Yamamoto & S. Akao: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 718 (2008).
- 5) K. Suzuki, H. Oguro, T. Yamakawa, A. Yamamoto, S. Akao & Y. Saeki: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 237 (2008).
- 6) T.E. Devine & L.D. Kuykendall: *Plant Soil*, **186**, 173 (1996).

(佐伯雄一, 宮崎大学農学部)