

根粒菌生態機能を活用した 環境保全型ダイズ栽培技術の開発

佐伯 雄一*

1 はじめに

「日本人の伝統的な食文化」がユネスコ無形文化遺産に登録されたのは2013年（平成25年）のことです。日本の食に欠かせない重要な作物の一つにダイズがあります。ダイズは味噌、醤油、豆腐、納豆などの原料で、種子中に7%もの窒素を蓄えるタンパク質含量の高い作物で「畑の肉」とも呼ばれます。必須アミノ酸を含む20種類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。このように、日本食を支える上で重要なダイズですが、国内自給率は6~7%を推移しています。近年では、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、国内消費量の90%以上のダイズを輸入に依存している日本においては、ダイズの増産・安定供給が求められるのは当然のことと言えます。農林水産省では、令和12年までに生産量を現在のおおよそ1.5倍、自給率を10%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160kg/10a（令和3年）程度であり、水稻収量の1/3以下となっています。ダイズ収量を300kg/10a得ようとするには窒素25kgの吸収が必要とされています。ところが、ダイズは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。そのため、ダイズ生産量確保のためには、地力窒素の向上と土壌水分管理が重要とされています。また、施肥窒素によるダイズの生育コントロールが難しい反面、根粒菌との共生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応した窒素供給が可能で、ダイズと根粒菌の共生窒素固定は、好適条件下で10a当たり30kg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、ダイズと共生する微生物であるダイズ根粒菌は、微生物資材としての有効利用が期待されています（写真1）。



写真1 窒素固定能の高い有用根粒菌（USDA110株）の接種効果とダイズ根粒

左：根粒菌無接種、中央：有用根粒菌接種、右：ダイズの根粒

*宮崎大学農学部

共生窒素固定の有効活用について、これまでも窒素固定能の高い根粒菌が選抜され、人工増殖した根粒菌をダイズ種子の播種時に接種し、栽培することで収量増大が図られてきました。しかし、窒素固定能の高い有用根粒菌が宿主ダイズに感染する前に、その土壤に適応した土着の窒素固定能の低い根粒菌が感染するケースが多く、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が問題になってきました。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。土壤には特定の根粒菌が土着化・優占化して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、宿主に適応して土壤中での占有率を高め得たと考えられます。根粒菌の生態学的研究の一つに、どのようなゲノム多様性を有する根粒菌がどのような土地・土壤にどのような群集を形成しているのか調べる研究があります。これは、土壤の理化学的性質や緯度・高度の変化に伴う地域ごとの温度（地温）に対する根粒菌の順化や環境傾度による宿主ダイズへの親和性の変化などを評価する上で重要なテーマの一つとなっています。本稿では、日本におけるダイズ根粒菌の多様性、地理的分布と根粒菌群集の変遷について、これまで得られたデータを抜粋整理して紹介します。

2 ダイズ根粒菌の地理的分布

ダイズ根粒菌種は多数報告されていますが、主なものでは、*Bradyrhizobium japonicum*、*Bradyrhizobium elkanii*、*Bradyrhizobium diazoefficiens*、*Sinorhizobium/Ensifer fredii* が知られています。根粒菌生態を解析するた

めには、根粒菌を分類する指標が必要となります。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。DNA配列の多型を検出する方法であれば、系統学的な遠近が評価できるため、系統関係情報を得ることが可能となります。同属同種の多様性を評価するためには、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。その中で比較的古くから利用されてきたのが、16S-23S rRNA 遺伝子 internal transcribed spacer (ITS) 領域です。ITS領域は、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。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菌株を選抜しました¹⁾。これらの基準菌株との比較で、土着ダイズ根粒菌の分布と多様性に関する解析を行っています。日本各地から土壤を採取し、試料土壤を添加したポットで数種類のダイズ品種を栽培し、着生した根粒からダイズ根粒菌を分離します。ゲノムを抽出してITS領域をPCR増幅し、増幅産物の多型解析を行いクラスター解析をします。その結果、日本の弱酸性から中性の土壤においては北海道から沖縄にかけて、主にBj123、Bd110、Bj6、Be76の4つのクラスター（種名と菌株番号の組み合わせでクラスターを表記）に分類される根粒菌が土着化していることが示されました（図1）^{2, 3, 4)}。また、アメリカの土着ダイズ根粒菌解析の結果でも、北部でBj123、温暖な地域でBj6やBj110、亜熱帯地域で*B. elkanii* 根粒菌が優占している点で日本と類似していると言えます⁵⁾。同様の結果は、ヒマラヤの高度による気候帯の違いによる土着根粒菌解析の結果でも得られています^{6, 7)}。気候帯による土着

ダイズ根粒菌群集構造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。実際に、実験室レベルで根粒形成遺伝子の温度依存的発現が根粒菌によって異なることが確認されています⁸⁾。特に*B. elkanii*は、高い温度における根粒形成遺伝子の高発現が明らかとなっています。一方で、沖縄では、琉球石灰岩を母材とするアルカリ性の土壤からは*S. fredii*が多く分離され、弱酸性から中性の土壤ではBj6クラスターの株や*B. elkanii*が多数分離されます³⁾。多くの報告から、弱酸性から中性土壤には*Bradyrhizobium*属ダイズ根粒菌が優占化し、塩類化アルカリ性土壤には*S. fredii*が優占化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*や*B. diazoefficiens*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。このことは、例えば日本で開発されたダイズ栽培技術が類似した気候の世界中の栽培地域で応用できることも示唆しています。一方で、アジアモンスーン地域に特徴的な農業である水稲作と関連して田畑輪換や転換畑のダイズ根粒菌群集構造を見ると少し様子が異なります。以下にその概略を紹介します。

3 水田転換畑におけるダイズ根粒菌群集構造の特異性

緯度に沿ったダイズ根粒菌群集構造の変遷とは別に、水田転換畑などでは*B. diazoefficiens*に分類されるBd110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明らかになってきました。図1の日本地図で示した秋田、山梨、静岡、高知、福岡、徳之島の土壤はグライ土、灰色低地土、細粒質

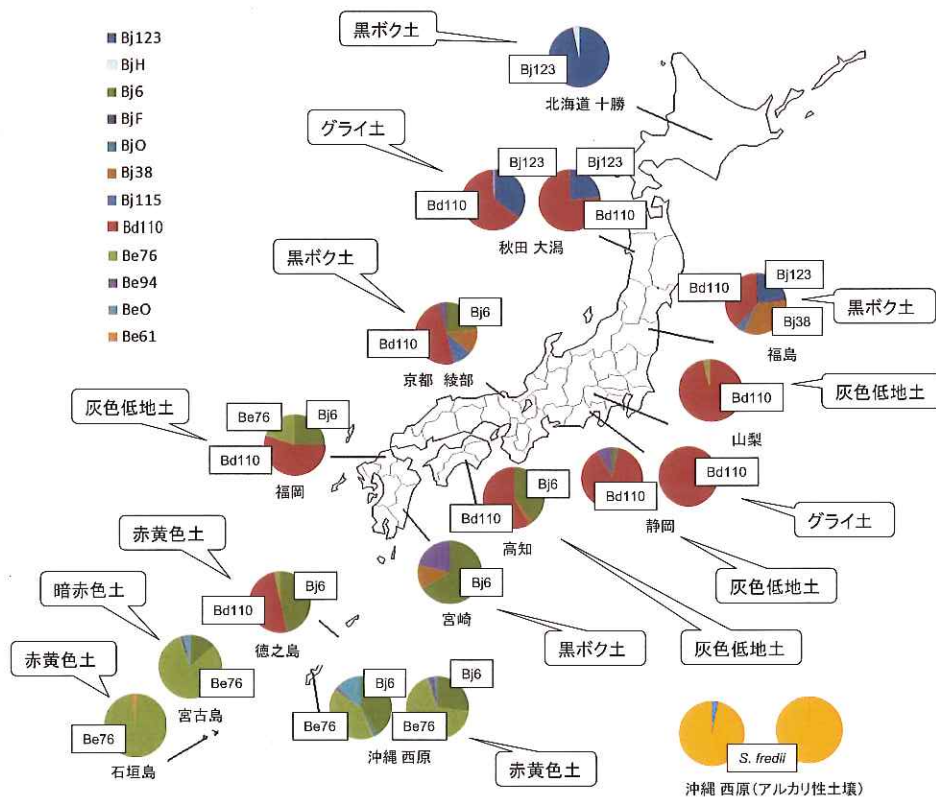


図1 感染根粒菌群集構造解析を基にした日本の土着ダイズ根粒菌の分布

各地の土壤で栽培したダイズ根粒の感染根粒菌群集構造を円グラフで示し、主な根粒菌クラスターと試料土壤を示した。

赤黄色土です。グライ土、灰色低地土は、水田に利用されることが多いのですが、輪作や転換畑としてダイズが作られるようになってきている場合も多く、このため、ダイズ根粒菌も土壤に生息します。水稲作で一定期間湛水状態が続く土壤や、保水性が高く還元的になりやすい細粒質土壤は酸素の少ない嫌気的な環境になり、微生物は低酸素状態に晒されることとなります。そのため、微生物の呼吸は嫌気呼吸になり、嫌気的環境下でエネルギー獲得効率の高い微生物が優占すると考えられます。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。脱窒は土壤細菌の代表的な嫌気呼吸の一つで、水田土壤や常に土壤水が保持されている微細土壤粒子間隙のような嫌気的環境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。亜酸化窒素 (N_2O) を窒素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ガスとして N_2O が大気中に放出されることとなります。根粒菌の脱窒能は *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌についてよく調べられています⁹⁾。同じ *Bradyrhizobium* 属根粒菌でもその脱窒能は異なっています。*B. diazoefficiens* は N_2 まで還元する完全脱窒能を示します。しかし、他の *Bradyrhizobium* 属根粒菌は最終産物である N_2 までの還元活性を示さない不完全脱窒能となります。*B. elkanii* は亜硝酸までの還元活性を示し、*B. japonicum* は N_2O を放出する不完全脱窒能を示す株、全く脱窒能を示さない株に分類されることが明らかにされています (表1)。水田転換畑など一定期間の湛水条件を経た土壤では、完全脱窒能を有する *B. diazoefficiens* 根粒菌が優占し、一般的な畑土壤では *B. japonicum* や *B. elkanii* 根

表1 *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌の脱窒活性

脱窒活性	根粒菌種
$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$	<i>B. diazoefficiens</i>
$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$	<i>B. japonicum</i>
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	<i>B. elkanii</i>
NO_3^-	<i>B. japonicum</i> <i>B. liaoningense</i>

粒菌が優占している土壤が多く検出されます。その理由として、完全脱窒能を有する *B. diazoefficiens* は、 N_2O までの脱窒能の根粒菌に比べて、 N_2O 還元過程の分、エネルギー獲得効率が高く¹⁰⁾、嫌気的環境下の土壤において優占するものと考えられます。このような水田転換畑に特徴的な *B. diazoefficiens* の優占化は、各地で認められ、私たちの研究室では、多湿黒ボク土、灰色低地土、グライ土、細粒質赤黄色土で *B. diazoefficiens* が優占していることを確認しています。また、同様の現象は熱帯のフィリピンでも観察されています¹¹⁾。

このことを実験的に検証するために、土壤の酸化還元状態に着目して、土壤中での根粒菌株の生残性と土壤定着性を評価することによって、湛水が根粒菌の土壤中での占有率に与える影響に関して検討を行いました。滅菌した黒ボク土及び灰色低地土に日本国内に分布する根粒菌に関する研究⁴⁾を元に、4菌株 (*B. japonicum* USDA6^T、USDA123、*B. elkanii* USDA76^T、*B. diazoefficiens* USDA110^T) を混和してマイクロコズム土壤を調製し、酸化的土壤 (畑条件)、湛水した土壤を還元的土壤 (湛水条件) とし、25℃ 暗所の一定条件で培養しました。培養30日目及び60日目に採取した土壤から、環境DNAの抽出を行い、各菌株の遺伝子を検出し、その占有率を評価しました。解析の結果、灰色低地土マイクロコズムでは、USDA110株の占有率を予め上げた状態で培養を行ったとこ

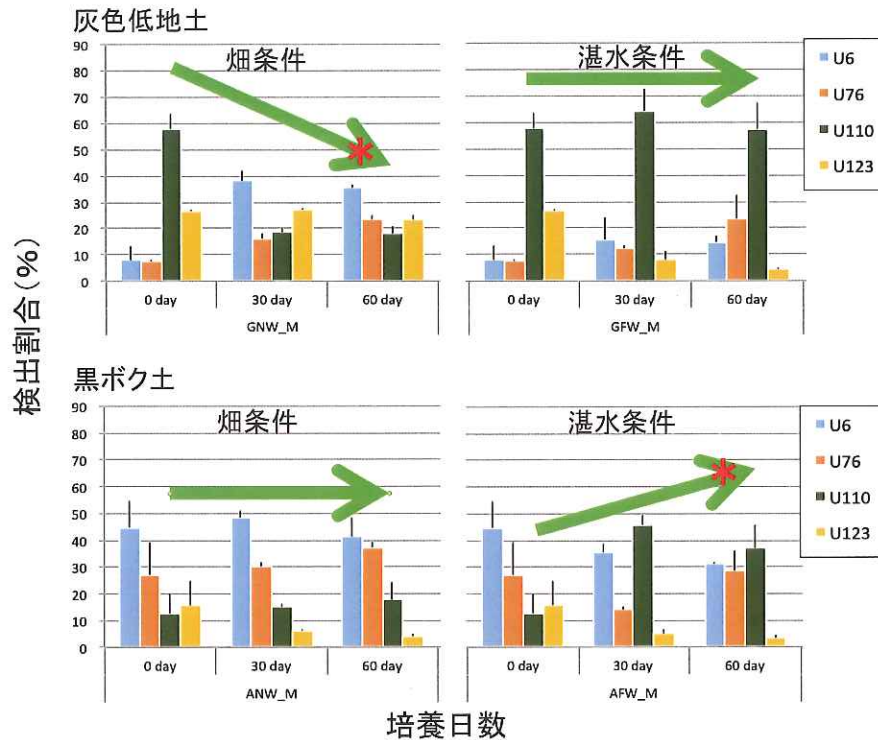
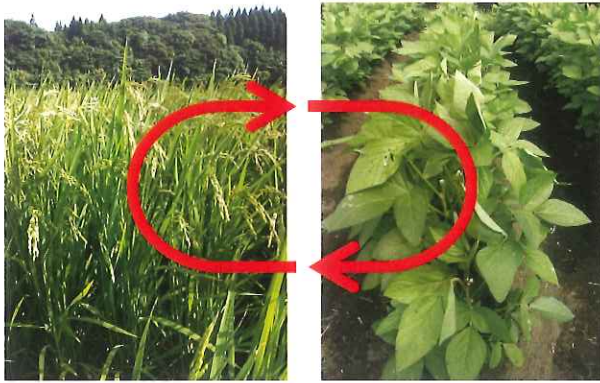


図2 湛水条件の違いによる土壌中の根粒菌群集構造の推移
矢印はUSDA110株（緑）の検出率の変化を示し、*は有意に変化したことを示す。

ろ、畑条件では有意に減少し、湛水条件ではその高い占有率を維持しました。黒ボク土マイクロコズムでは、USDA110株の占有率を下げた状態で培養したところ、畑条件では低い状態のままでしたが、湛水条件では有意にその占有率の上昇が認められました（図2）¹²⁾。この結果は、完全脱窒能を有する根粒菌の土壌中での占有率が、土壌を嫌气的条件に晒すことによって有意に上昇すること及び畑状態にしたままでは完全脱窒能を有する根粒菌の占有率が下がるため、土壌の湛水処理などを行うことによって一定期間嫌气的条件に置くことの必要性を示唆しています。このように、土壌管理によって根粒菌の生態機能を利用して有用根粒菌を優占化させ、さらにダイズの根粒占有率を高め得る農業技術として、根粒菌群集構造の人為的コントロールの可能性が拓けてきています。

4 おわりに

窒素固定能が高いことで良く知られている有用根粒菌 *B. diazoefficiens* USDA110^T 株は共生窒素固定能が高いだけでなく、完全脱窒能を有するためにN₂Oガスの発生を抑制し、収量増も期待できます。本研究のさらなる展開によって、実際のフィールドにおいて有用根粒菌を人為的に土壌に定着させ、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。筆者は宮崎大学で根粒菌生態の研究を25年以上に渡り続けています。温暖な宮崎平野では早期水稻栽培が盛んであり、コメの収穫後、秋ダイズの栽培が可能です（写真2）。水稻と麦やダイズは輪作体系に組み込まれる作物ですが、一年のうち水稻とダイズの二毛作を行うことは、環境保全型ダイズ栽培となるとともに水田のフル活用技術としても期待されます。



早期水稲栽培

秋ダイズ栽培

写真2 早期水稲と秋ダイズの田畑輪換作

謝辞

筆者の研究は、JSPS科学研究費補助金(21KK0103、22K05369)及び宮崎大学ミッション実現戦略プロジェクトの支援を受けて行っています。関係各位に深謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) Saeki Y. *et al.* (2004) Grouping of Bradyrhizobium USDA Strains by Sequence Analysis of 16S rDNA and 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Region. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50, 517-525
- 2) Saeki Y. *et al.* (2006) Diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 418-426
- 3) Suzuki K. *et al.* (2008) Diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating rhizobia in the Okinawa islands, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 54, 237-246
- 4) Saeki Y. *et al.* (2013) Mathematical ecology analysis of geographical distribution of soybean-nodulating bradyrhizobia in Japan. *Microbes Environ.* 28, 470-478
- 5) Shiro S. *et al.* (2013) Genetic diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 3610-3618
- 6) Risal CP. *et al.* (2010) Genetic diversity of native soybean bradyrhizobia from different topographical regions along the southern slopes of the Himalayan Mountains in Nepal. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33, 416-425
- 7) Adhikari D. *et al.* (2012) Genetic diversity of soybean-nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties. *Plant Soil.*, 357, 131-145
- 8) Shiro S. *et al.* (2016) Temperature-dependent expression of *nodC* and community structure of soybean-nodulating bradyrhizobia. *Microbes Environ.*, 31, 27-32
- 9) Sameshima-Saito R. *et al.* (2006) Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia. *Microbes Environ.*, 21, 174-184
- 10) Thauer RK. *et al.* (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41, 100-180
- 11) Mason MLT. *et al.* (2018) Influence of flooding and soil properties on the genetic diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the Philippines. *Heliyon*, 4, e00921
- 12) Saeki Y. *et al.* (2017) Effect of flooding and the *nosZ* gene in bradyrhizobia on bradyrhizobial community structure in the soil. *Microbes Environ.*, 32, 154-163