

学 位 論 文 題 名

Studies on nodule-forming bacteria from Indonesian leguminous-tree, *Paraserianthes falcataria* (L). Nielsen

(インドネシア原産豆科木本植物, *Paraserianthes falcataria* (L). Nielsen, 由来の根粒菌に関する研究)

学位論文内容の要旨

豆科草本類と根粒菌との共生現象については数多くの研究がなされてきている。一方、熱帯には多くの豆科木本類が存在し、それらにおいても根粒菌が存在することは以前より知られているが、草本類のそれらとは比較にならないほど研究が進んでいない。それでも比較的よく研究されているものとしては、*Acacia* 属や *Leucaena* 属があげられるが、その他の植物についてはほとんど研究が行われていない。

Paraserianthes falcataria は、イリアンジャヤやマルクーが原産で、現在はインドネシア各地で栽培されている熱帯豆科木本類の代表の一つである。これは、製紙工業（パルプ）や建材として重要であるとともに、森林再生に好適な樹木として、特にジャワ島では広く植林が進められている。*Paraserianthes falcataria* は、生育が速く且つあまり手入れのいらない木であり、また窒素固定菌である根粒菌を共生させていることでも知られている。

そこで、この木と共生している根粒菌(rhizobia)の多様性と生態学的研究及びその共生菌としての有用性を対象として研究を行った。まず、*P. falcataria* に根粒を作ることのできる細菌を検討する目的で、根粒から細菌の分離を試み、29種の菌株を *P. falcataria* から分離した。また大豆から分離したものであるが、*P. falcataria* にも感染して、共生できる菌株1株を得た。これら30株を用いてそれらの共生の能力、表現型、遺伝子型について更に詳細な研究を進めた。

共生能力（根粒形成能力）の検討には、*P. falcataria* に加えて *Acacia mangium* と草本類の *Phaseolus vulgaris*, *Macroptillum artopurpureum* と *Glycine max* を用いた。

表現型の指標としては、生育速度、食塩耐性、抗生物質耐性、酸またはアルカリ産生試験、メラニンの生産、インドール酢酸の生産、細胞の脂肪酸組成を用いた。一方遺伝子型の指標としては16S rDNAの塩基配列と *nodC* 遺伝子の部分塩基配列を用いた。

その結果、分離された菌は、29株中26株が宿主である *P. falcataria* に根粒を形成するとともに、感染した宿主植物は非感染植物に比較して生長が速く根の生育も良

好であり、両者は相互利益のある共生関係にあることが確認された。また分離された菌は、表現型から大きく二つに分類された。即ち、速生育菌と遅生育菌に分けられる。*P. falcataria* では速生育菌と遅生育菌の両者が共存しており、根粒の中では数の上で遅生育菌が優占菌であることを見出した。これとは対照的に、*Acacia mangium* では遅生育菌のみが存在していた。これは、これら二つの植物種の根粒の中での根粒菌による相互関係の差異を表していると考えられるが、その機構については未解明である。

遅生育菌は、インドール酢酸の産生によって二つに分類できる。インドール酢酸産生を示すものは *Bradyrhizobium elkanii* グループ、産生のないものは *Bradyrhizobium japonicum* グループである。食塩耐性については低いものが多いが、高いものもあり、特徴的ではなかった。メラニン産生については、産生のないものが多かったが産生するものもあることから、特徴的ではなかった。抗生物質耐性については *Bradyrhizobium elkanii* グループは、*Bradyrhizobium japonicum* グループよりも高かった。また興味ある発見は、ここで得られた3株の *Bradyrhizobium elkanii* グループは、広い宿主域を持ち、検討したいずれの植物にも根粒を形成した。しかしながらこれは、一般的に当てはまることではなく様々の宿主域を示すものも得られている。

速生育菌は、酸を産生し、抗生物質耐性は、*Bradyrhizobium elkanii* グループと *Bradyrhizobium japonicum* グループの中間であった。メラニン産生については、産生するものが多かったが、特徴的な傾向はなかった。食塩耐性が高いことに共通点があった。インドール酢酸産生については特徴的な傾向はなかった。また脂肪酸組成から見ると速生育菌には、遅生育菌には存在しない脂肪酸(2-hexyl-cyclopropaneoctanoic acid methyl ester, 3-hydroxy-hexadecanoic acid methyl ester) が存在していた。

遺伝子型による分類を 16S rDNA 全塩基配列の比較で行ってみたところ、速生育菌は、*Rhizobium tropicii* と同じグループに入ったが、遅生育菌には多様性が大きく認められ *Bradyrhizobium elkanii* と同じグループと *Bradyrhizobium japonicum* と *Blastobacter denitrificans* と同じグループに入るものの2群に分かれた。そこでさらに根粒形成遺伝子の一つである *nodC* の部分塩基配列の比較によって更に詳細に検討した。現在のところ5株しか結果がでていないが、16S rDNA の塩基配列からの結果と矛盾するものはなかった。しかし、これらの遅生育菌は、極めて多様性に富んでおり、遺伝子型による分類と共生現象の関係から再検討が必要であると考えられる。

以上のように、*Paraserianthes falcataria* には特定の根粒菌が存在し、その感染によって宿主植物の生育が改善されること、またそれらの根粒菌はこれまでの分類学的手法の範囲を超える多様性があり、根粒菌の分類については新たな指標を取り込んだ整理が必要であることを示した。

これらの研究は、熱帯アジアにおける豆科木本類の根粒菌に関する初めてのものであり、これらの根粒菌の植物生育促進への有用性を示すとともに根粒菌の多様性を示した。この成果は当該分野における分類学及び生態学に基礎的知見を加えるとともに、これらの根粒菌に森林再生の促進などへの応用的可能性があることを示したものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	富田房男
副査	教授	横田 篤
副査	教授	松井博和
副査	助教授	浅野行蔵

学位論文題名

Studies on nodule-forming bacteria from Indonesian leguminous-tree, *Paraserianthes falcataria* (L). Nielsen

(インドネシア原産豆科木本植物, *Paraserianthes falcataria* (L). Nielsen, 由来の根粒菌に関する研究)

本論文は、5章からなり、図16、表5、文献74を含む総頁数71の英語論文である。別に参考論文18編が付されている。

豆科草本類と根粒菌との共生現象については数多くの研究がなされてきている。一方、熱帯には多くの豆科木本類が存在し、それらにおいても根粒菌が存在することは以前より知られているが、草本類のそれらとは比較にならないほど研究が進んでいない。*Paraserianthes falcataria* は、イリアンジャヤやマルクーが原産で、現在はインドネシア各地で栽培されている熱帯豆科木本類の代表の一つである。これは、製紙工業（パルプ）や建材として重要であるとともに、森林再生に好適な樹木として、特にジャワ島では広く植林が進められている。*Paraserianthes falcataria* は、生育が速く且つあまり手入れのいらない木であり、また窒素固定菌である根粒菌を共生させていることでも知られている。

そこで、本研究では、この木と共生している根粒菌(rhizobia)の多様性と生態学的研究及びその共生菌としての有用性を対象として研究を行った。

まず、*P. falcataria* に根粒を作ることのできる細菌を検討する目的で、根粒から細菌の分離を試み、29種の菌株を *P. falcataria* から分離した。また大豆から分離したものであるが、*P. falcataria* にも感染して、共生できる菌株1株を得た。これら30株を用いてそれらの共生の能力、表現型、遺伝子型について更に詳細な研究を進めた。

P. falcataria に加えて *Acacia mangium* と草本類の *Phaseolus vulgaris* ,

Macroptillum artopurpureum と *Glycine max* を用いて共生能力（根粒形成能力）の検討を行った。その結果、分離された菌は、全て宿主である *P. falcataria* に根粒を形成するとともに、感染した宿主植物は非感染植物に比較して生長が速く根の生育も良好であり、両者は相互利益のある共生関係にあることが確認された。また分離された菌は、表現型から速生育菌と遅生育菌に分けられた。

遅生育菌は、インドール酢酸の産生の有無によって *Bradyrhizobium elkanii* グループ（産生有り）、*Bradyrhizobium japonicum* グループ（産生無し）に分類できた。*Bradyrhizobium elkanii* グループは、*Bradyrhizobium japonicum* グループよりも抗生物質耐性が高かった。ここで得られた3株の *Bradyrhizobium elkanii* グループは、広い宿主域を持ち、検討したいずれの植物にも根粒を形成した。

速生育菌は、酸を産生し、抗生物質耐性は、*Bradyrhizobium elkanii* グループと *Bradyrhizobium japonicum* グループの間であった。食塩耐性が高いことに共通点があった。また脂肪酸組成から見ると速生育菌には、遅生育菌には存在しない脂肪酸（2-hexyl-cyclopropaneoctanoic acid methyl ester, 3-hydroxy-hexadecanoic acid methyl ester）が存在していた。

遺伝子型による分類を 16S rDNA 全塩基配列の比較で行ってみたところ、全ての速生育菌は、*Rhizobium tropicii* と同じグループに入ったが、遅生育菌は *Bradyrhizobium elkanii* と同じグループと *Bradyrhizobium japonicum* と *Blastobacter denitrificans* と同じグループに入るものの2群に分かれ、極めて多様性に富んでいた。

以上のように、*Paraserianthes falcataria* には特定の根粒菌が存在し、その感染によって宿主植物の生育が改善されること、またそれらの根粒菌はこれまでの分類学的手法の範囲を超える多様性があり、根粒菌の分類については新たな指標を取り込んだ整理が必要であることを示した。

これらの研究は、熱帯アジアにおける豆科木本類の根粒菌に関する初めてのものであり、これらの根粒菌の植物生育促進への有用性を示すとともに根粒菌の多様性を示した。この成果は当該分野における分類学及び生態学に基礎的知見を加えるとともに、これらの根粒菌に森林再生の促進などへの応用的可能性があることを示したものである。

よって審査員一同は、ティティック クリスウィダルティ プラナ が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。