

学位論文題名

Analysis of the interaction between diazotrophic bacteria and *Melastoma malabathricum* L. under N-deficient condition.

(窒素欠乏環境下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析)

学位論文内容の要旨

窒素栄養は農作物の生育を制限する主要因であることから大量の窒素を農地に投入し、農作物の生産性を保っているのが現状である。しかしながら、農地へ過剰投入された化学窒素肥料の流出による地下水汚染や化学窒素肥料に由来する NO_x の大気中への放出による地球温暖化の促進等の環境負荷が問題となっており、環境負荷の低減に配慮した持続的農業技術の開発が望まれている。土壌微生物は生物地球化学的な物質循環に大きな役割を果たしており、その重要性が指摘されているが、土壌微生物生態系に関する知見は未だ不十分である。さらに、植物根近傍の根圏と呼ばれる土壌は他の土壌に比べて10~100倍もの微生物個体群が存在すると言われており、このような微生物個体群の中には「植物生育促進根圏細菌」と呼ばれる植物の生育を促進する効果を持つ細菌の存在が見いだされ、その活用が試みられている。本研究では土壌生態系の高度利用による新規持続的農業技術の確立を目指し、植物生育促進根圏細菌とその機能に着目した植物-根圏細菌相互作用の解析を行った。

窒素固定細菌は大気中の窒素ガスを植物が利用可能なアンモニウムに変換できる細菌であり、この生物的に固定された窒素は貧栄養環境の生態系において重要な窒素のインプットとして考えられている。本研究で解析された灌木のメラストーマ (*Melastoma malabathricum* L.) は貧栄養環境 (特に窒素栄養) 及びpH4以下の酸性土壌にも適応して生育する熱帯のパイオニア植物である。メラストーマは低窒素環境において窒素固定細菌を利用して窒素栄養を獲得しているという仮説のもと、(1) 窒素欠乏条件下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析と(2) メラストーマ根圏土壌に生息する窒素固定細菌の多様性解析を行った。

(1) 窒素欠乏条件下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析: 北海道大学の温室内で無窒素及び0.01 mM窒素条件下 (pH 4.2) で3ヶ月間の水耕栽培を行い、低窒素環境に対するメラストーマの適応能力を調べた。無窒素水耕培養条件下にも関わらずメラストーマは明確な窒素欠乏症状を示さずに、植物体の乾燥重量と窒素含量の有意な増加が確認された。このような完全な無窒素培養条件下で正常に生育できる植物は根粒を形成する植物以外では認められていない。なお、内生菌共生植物においても完全無窒素培地での正常な生育は困難である。そこでメラストーマは微生物との係わりでかなり特殊な関係を構築していると推測された。無窒素条件下でのメラストーマへの窒素栄養供給源の候補として、まず多くの植物でその存在が確認されている内生の窒素固定細菌のメラストーマの窒素獲得への関与を検討した。*in situ*で窒素固定活性測定の指標となるアセチレン還元活性 (ARA) 法、および安定同位体 ^{15}N を用いた植物体内への ^{15}N の取り込み試験の結果、内生窒素固定細菌のメラストーマへの窒素栄養の供給の可能性は低いと判断された。その一方で、メラストーマの水耕培養液中から高いARAが検出され、22種類の窒素固定細菌を分離することに成功した。16S rDNA配列と*nifH*遺伝子の部分塩基配列の比較によりこれらの分離菌株は*Burkholderia vietnamiensis* 及び*B. cepacia*と近縁であることが示唆された。無窒素条件

下におけるこれら分離菌株のメラストーマに対する生育促進効果を調べる為にノトバイオーム型の栽培でメラストーマの生育を調べた。4ヶ月の栽培後、培養液中から分離した窒素固定細菌の1菌株を接種したメラストーマでは無菌的な栽培を続けた対照区と比べて植物体の乾燥重量と窒素含量の有意な増加が認められた。このノトバイオーム型の栽培では接種菌はメラストーマからの根分泌物を炭素源として利用して、大気中の窒素ガスから固定した窒素を窒素栄養として直接的または間接的にメラストーマに提供している可能性が示唆された。この結果から、窒素欠乏条件下ではメラストーマとある種の窒素固定細菌との間に半共生的な関係が成立していることが明らかとなり、この植物-微生物相互関係は酸性硫酸塩土壌など劣悪な環境に自生するメラストーマ根圏でも同様の微生物群が存在すると推測された。

(2) メラストーマ根圏土壌に生息する窒素固定細菌の多様性解析: インドネシアの地理的には近いが土壌特性の異なる3種類の土壌(酸性硫酸塩、泥炭及び砂質土壌)に自生しているメラストーマの根圏及びバルク土壌における窒素固定細菌の多様性を解析し比較した。3種類の土壌に自生するメラストーマの根圏及びバルク土壌から直接抽出したDNAを鋳型として *nifH* 遺伝子を標的としたPCRにより *nifH* 遺伝子断片を回収し、合計300の *nifH* 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの *nifH* 遺伝子配列をそれぞれ全ての組み合わせで相同性を求めて、ある一定の相同性の基準に従ってこれらの配列をクラスタリングしたところ、29のOTU (operational taxonomic unit) に分類することができた。3種類の土壌間でOTUの構成は明確に異なり、窒素固定細菌の多様性は土壌特性に強く影響を受けている事が示唆された。また、酸性硫酸塩土壌以外の2土壌では根圏土壌とバルク土壌間でOTUの構成に明確な差は認められなかったものの、酸性硫酸塩土壌に自生するメラストーマでは根圏土壌とバルク土壌の間のOTU構成に差が見られ、*nifH* 遺伝子の多様性は酸性硫酸塩土壌ではメラストーマ根からの影響を受けて根圏土壌とバルク土壌間で変化していることが示唆された。さらに生物の多様性を評価する指標であるShannon diversity indexに基づく比較によってもこの結果は支持され、*nifH* 遺伝子の多様性は酸性硫酸塩土壌ではバルク土壌よりも根圏土壌の方が低かった。この酸性硫酸塩土壌に特徴的な *B. vietnamiensis* は水耕栽培で認められた *B. vietnamiensis* と極めて類似しており、この菌の窒素固定が重要と推測された。このように酸性硫酸塩土壌においてメラストーマは根分泌物の放出などにより根圏土壌に特殊な窒素固定細菌を集積して窒素固定細菌共同体を形成して劣悪な環境に適応して窒素栄養獲得を行っていることが明らかとなった。

近年、地球環境保護に対する意識の高まりにともない、環境負荷の高い化学肥料依存型の農業から循環型の持続的農業への転換が求められ、次世代施肥技術の開発が求められている。本研究は窒素欠乏環境下においてパイオニア植物であるメラストーマと根圏に生息する窒素固定細菌との間に窒素栄養獲得に関して相互依存関係が存在する事を示唆する知見を獲得した。メラストーマ根圏に生息する窒素固定細菌の生態とメラストーマの相互関係についてより詳細に理解する事は低投入持続型農業のための有効な窒素管理戦略の一助になると期待でき、本論文の成果は今後の根圏制御技術の開発の基盤となるものであり重要な知見を獲得したことにある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 波多野 隆 介

副 査 客員教授 信 濃 卓 郎 (北農研センター

連携講座)

副 査 助 教 渡 部 敏 裕

学 位 論 文 題 名

Analysis of the interaction between diazotrophic bacteria and *Melastoma malabathricum* L. under N-deficient condition.

(窒素欠乏環境下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析)

当論文は6章からなり、図14、表6、引用文献87を含む、総頁数72の英文論文であり、別に1編の参考論文が添えられている。本論文の目的は、化学窒素肥料使用量の低減に向けて窒素固定細菌を利用した窒素管理技術を開発するための基礎研究として、まず低窒素環境に適応して生育可能なメラストーマと窒素固定細菌の相互関係を研究する事によって低窒素環境下におけるメラストーマの窒素獲得戦略を解明することにある。

農地へ過剰投入された化学窒素肥料の流出による環境負荷が問題となっており、環境負荷の低減に配慮した持続的農業技術の開発が望まれている。窒素固定細菌により生物的に固定された窒素は貧栄養環境の生態系において重要な窒素のインプットとして考えられており、化学窒素肥料に変わる植物への窒素栄養供給の手段として持続的農業への利用が注目されている。一方、メラストーマは貧栄養環境に適応して生育する植物として知られており、その低窒素環境における適応能力と窒素獲得戦略には興味を持たれる。そこで本研究では、メラストーマが低窒素環境では窒素固定細菌を利用して窒素栄養を獲得しているという仮説のもと、(1) 窒素欠乏条件下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析と(2) メラストーマ根圏土壤に生息する窒素固定細菌の多様性解析を行った。

(1) 窒素欠乏条件下における窒素固定細菌とメラストーマの相互関係の解析

窒素欠乏条件下における水耕栽培試験の結果、無窒素条件下においてさえもメラストーマの乾燥重量と窒素含量の有意な増加が確認された。この水耕培養液中からは窒素固定活性の指標となる高いアセチレン還元 (ARA) 活性が検出され、22種類の窒素固定細菌を分離することに成功した。

16S rDNA配列と*nifH* 遺伝子の部分塩基配列の比較によりこれらの分離菌株は*Burkholderia vietnamiensis* 及び*B. cepacia*と近縁であることが明らかになった。分離菌株のメラストーマに対する生育促進効果を調べる為に無窒素条件のノトバイオート型の栽培の結果、窒素固定細菌分離菌株の1菌株を接種したメラストーマでは無菌的な栽培を続けた対照区と比べて植物体の乾燥重量と窒素含量の有意な増加が認められた。このノトバイオート型の栽培では接種菌はメラストーマからの根分泌物を炭素源として利用して、大気中の窒素ガスから固定した窒素を窒素栄養として直接的または間接的にメラストーマに提供している可能性が示唆された。この結果から、窒素欠乏条件下ではメラストーマとある種の窒素固定細菌との間に半共生的な関係が成立していることが予想された。

(2) メラストーマ根圏土壌に生息する窒素固定細菌の多様性解析

インドネシアの土壌特性の異なる3種類の土壌（酸性硫酸塩、泥炭及び砂質土壌）に自生しているメラストーマの根圏及びバルク土壌における窒素固定細菌の多様性を分子生物学的手法により解析し比較した。土壌から回収された*nifH* 遺伝子配列は系統解析の結果、29のOTU (operational taxonomic unit) に分類することができた。3種類の土壌間でOTUの構成は明確に異なり、窒素固定細菌の多様性は土壌特性に強く影響を受けている事が示唆された。また、酸性硫酸塩土壌以外の2土壌では根圏土壌とバルク土壌間でOTUの構成に明確な差は認められなかったものの、酸性硫酸塩土壌に自生するメラストーマでは根圏土壌とバルク土壌の間のOTU構成に差が見られ、*nifH* 遺伝子の多様性は酸性硫酸塩土壌ではメラストーマ根からの影響を受けて根圏土壌とバルク土壌間で変化していることが示唆された。さらに、*nifH* 遺伝子の多様性は酸性硫酸塩土壌ではバルク土壌よりも根圏土壌の方が低く、根圏に特定の窒素固定細菌が集積していることが示唆された。このように酸性硫酸塩土壌においてメラストーマは根分泌物の放出などにより根圏土壌に特殊な窒素固定細菌を集積して窒素固定細菌共同体を形成して劣悪な環境に適応して窒素栄養獲得を行っていることが予想された。

本論文において、窒素欠乏環境下においてパイオニア植物であるメラストーマと根圏に生息する窒素固定細菌との間に窒素栄養獲得に関して相互依存関係が存在する可能性が示された。メラストーマ根圏に生息する窒素固定細菌の生態とメラストーマの相互関係についてより詳細に理解する事は低投入持続型農業のための有効な窒素管理戦略の一助になると期待でき、本論文の成果は今後の根圏制御技術の開発の基盤となるものであり重要な知見を獲得したことにある。

よって、審査員一同は、佐藤敦哉が博士（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。