

博士論文

イネ根圏での窒素固定細菌の細菌間相互作用に応じた
機能動態の再現とその応用

吉留 大輔

第1章

序論

1-1 農耕生活の誕生とその確立

まず、agriculture という英語の語源を考えてみよう。以下は、「Online Etymology Dictionary」からの引用である。この単語は、15世紀半ばに、「耕す」を意味するラテン語 cultura に「農地」を意味する agri が付加した agricultura から誕生した。では、同じく 15 世紀半ばに cultura から誕生した culture とはどう使い分けられてきたのだろうか。この単語も、当初は agriculture と同じく「作物のために大地を耕す行為」を意味したが、「世話をする」という概念も包含していた。そして、時代を経るとともに世話をする対象が魚介類や微生物にまで拡大された。さらに 19 世紀には世話をする対象が人間にまで拡大し、「教育、精神の洗練を通じた人間の育成」からさらに「学問、審美眼という文明の知的側面」を意味するようになった。こうして、文化、すなわち「人間が自然に手を加えて形成してきた物心両面の成果。衣食住をはじめ科学・技術・学問・芸術・道德・宗教・政治など生活形成の様式と内容とを含む。西洋では人間の精神的な生活にかかわるものを文化と呼び、技術的発展のニュアンスが強い文明と区別する。(広辞苑より)」を意味する単語として確定した。すなわち、語源から解釈すると、我々の生活様式は農耕によって方向づけられたといえる。

農耕生活の誕生時期については現在でも議論が続いているが、今から 1 万 2000 年前頃に肥沃な三日月地帯の西側半分であるレバントにおいてというのが多くの学者の共通見解である (1-2,3)。最終氷期の終了により地球は温暖化し、人間は定住していても狩猟採集生活で十分量の食糧を確保できるようになっていた。ところが 1 万 3000 年前にヤングドリアスと呼ばれる亜氷期が始まって約 1300 年間続いたため人間は狩猟採集での食糧確保が十分にできなくなり、農耕の原型を始めるようになった。その後約 3000 年間にわたる栽培作物や家畜の確立の作業を経て、人間は農耕生活のみでも生活できるようになった。それとともに農耕生活は肥沃な三日月地帯全体に普及していった。農耕は余剰食糧をもたらすことも多く、これにより人口は増加していき、7000 年前には、1 万 2000 年前に比較して 10 倍の 1800 万人となった (Statista, Estimated global population from 10,000BCE to 2100)。人口が増えることで人間の生活様式に都市化という新しい潮流が加わり、これがのちにメソポタミア文明やエジプト文明の誕生につながった。これらの文明において、通貨を使用した商業活動、上

下水道や灌漑設備などのインフラ整備、厩の整備といった、現在の我々の生活様式の基礎が誕生した。

しかし、農業による食糧の確保を成しえた人間は、同時に、農業を維持させなければならない責務を負うことになった。一度農業によって達成した人口、およびそれを足場にした営みは、農業なしに存続することはできないからである。しかし悲しいことに、農業を持続させようとする人類の想いとは裏腹に、農業の本質は本来持続的なものではない。農業による食糧生産は地力の収奪を伴うため、地力回復作業を行わない限り、破綻してしまう。そのため人類は、農業によって獲得した豊かな営みを堅持するべく、地力回復の実現に向けたあらゆる策を現在までに講じ続けてきた。

1-2 ヨーロッパの農業における地力回復への戦い

古代では、地力回復は河川の氾濫による新鮮土壌の供給という自然現象に負うしかなかった。ただし、それは、氾濫の周期を記録することで暦を生み出した。

中世以降になると、ヨーロッパを中心に穀類農地における地力回復を図る様々な農業改革が記録されている (Fig. 1-1)。まずは、農地を二分して耕作と休閑を入れ替えることで地力回復を行う二圃式農業が始まり、それは、冬穀栽培、夏穀栽培、休閑を順繰りに行う三圃式農業へと発展した。さらに夏穀圃場にマメ科作物を植えることで根粒菌が行う窒素固定による窒素供給が導入されるようになった。その後、イギリスを中心として羊毛の需要拡大に応じた牧羊地の確保のため農地の囲い込みが行われ、その結果として羊の糞尿を農地に戻す窒素の循環を取り込んだ穀草式農業 (冬穀、夏穀、牧草、休閑の循環) へと展開し、最終的に 18 世紀には、生物窒素固定と厩肥の双方を利用する輪栽式農業 (夏穀、マメ科牧草、冬穀物、飼料用カブ)、大麦、クローバー (飼料用、マメ科)、小麦) が完成した。これらの農業改革により、18 世紀の穀物収穫量は 15 世紀の収穫量の 3~5 倍程度となった。

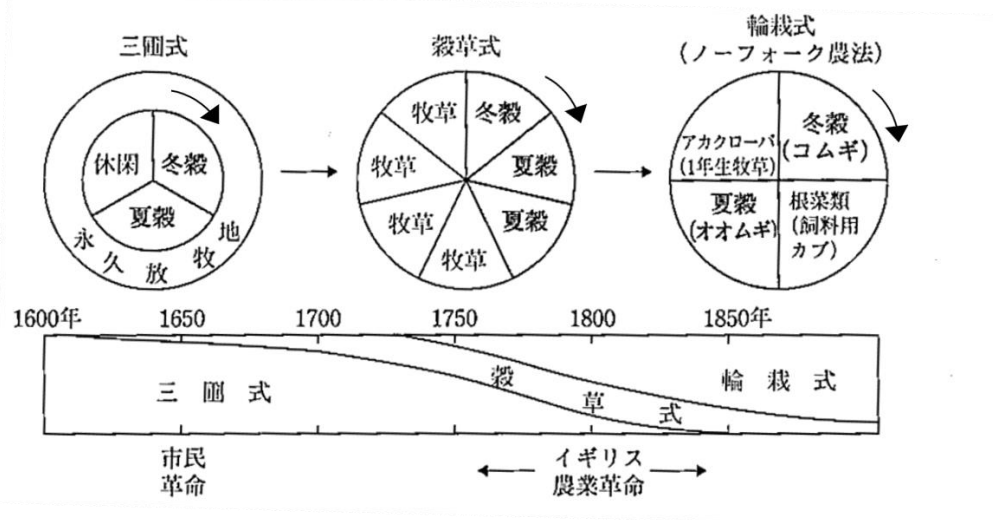


Fig. 1-1 農業改革の概要 (松中, 2003 を引用)

矢印は作付けの順序を示す。

次の 19 世紀には化学肥料を使用する画期的な農業が始まった。その概要を高橋英一の著作「肥料の来た道帰る道」「肥料になった鉱物の物語」より要約する。

化学肥料の誕生には産業革命が大きく関わっている。植物の生育には窒素、リン、カリウムの三要素が必須である。化学肥料は、まずリンで起こった。それ

により大量の骨粉廃棄物が生じた。産業革命の一つとして家畜骨の利用が拡大し、それにより大量の骨粉廃棄物が生じた。この骨粉置き場近傍の植物が旺盛に生育することが観察されたことから、骨粉を肥料として利用する方法が模索され、1842 年にローズによって過リン酸石灰が開発された。その後、19 世紀後半にアメリカでリン鉱石鉱床が発見されると、リン肥料の大量供給が実現された。カリウムに関しては、古くから植物灰が植物生育を旺盛にすることが認識されていたが、産業革命により大量の森林資源が燃料として燃やされるようになると、その灰がカリウムの供給源として利用されるようになった。その後、森林資源の枯渇に伴って植物灰供給に不安が生じたが、カリ鉱石の採掘技術の進歩によりカリ肥料の大量供給が実現された。窒素に関しては、多少複雑な経緯がある。産業革命以前の大航海時代に、ペルーの原住民が農地にグアノを投与することで良好な収穫量を挙げていることが既に知られていた。そして、産業革命により蒸気船が開発され輸送力が確保されたことで、このグアノの大量輸送が可能となった。ここにグアノには即効性があることが認識されたことが重なり、ヨーロッパ全土でグアノの需要が急拡大した。ところが、グアノの存在量は少量であったため、グアノの輸入開始後 20 年でグアノはほぼ枯渇してしまった。ここで幸運にもチリ硝石鉱床が発見され、硝酸ナトリウムとして窒素肥料の大量供給が実現された。

以上の化学肥料の利用による単収の増加に加えて、帝国主義による植民地の拡大やヨーロッパから南北アメリカやオセアニアへの人の移動による農地の拡大が相乗的に機能することで、この時期の世界の穀物収穫量は大きく増大し、それにより世界人口は 1800 年の 10 億から 1900 年の 15 億へと急上昇した (Fig. 1-2)。

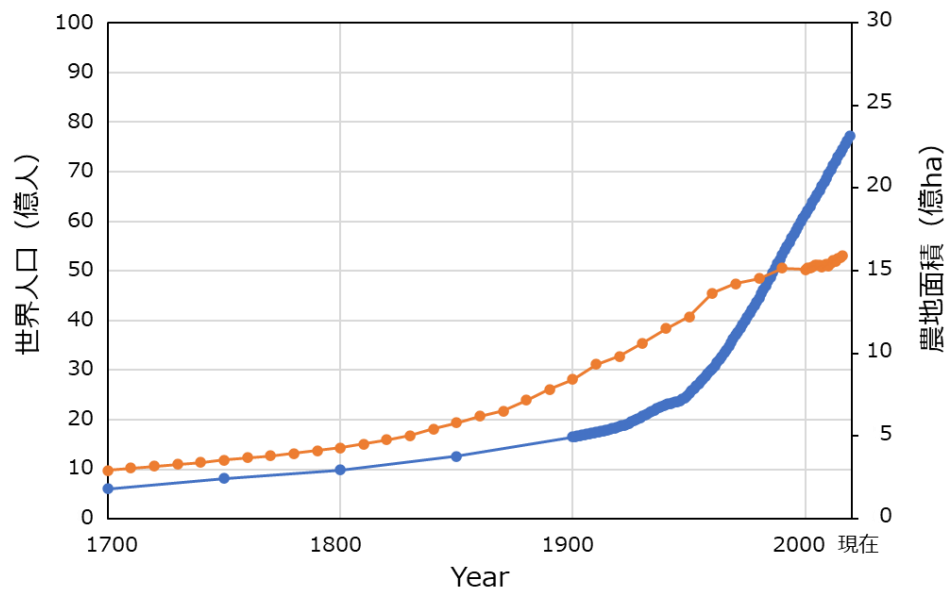


Fig. 1-2 18世紀以降の世界の人口と農地面積の推移（Our World in Data より作製）

●：世界人口、●：世界の農地面積

1-3 化学窒素肥料の光と影

19 世紀の鉱物資源の化学肥料としての使用開始は、19 世紀末には新たな懸念を生んだ。すなわち、鉱物資源が枯渇した時点で人口を支えるだけの食糧生産が行えなくなることへの懸念である。特にチリ硝石の前途に懸念を発したが、1898 年のクルックスの警告であり、「空気中に無尽蔵に存在する窒素分子に注目すべきである」と化学者たちを奮起させた。その中で 1908 年にドイツで誕生したのが、ハーバーによる窒素分子を水素で直接還元することによるアンモニアの生産技術であった。1913 年にボッシュによってハーバー法によるアンモニア生産が工業化されると、空中窒素由来の化学窒素肥料が大量かつ安価に供給できるようになった。工業的には硫酸アンモニウムとして供給することが簡便であったが、当初はチリ硝石由来の硝酸ナトリウムの使用に慣れていた農民の求めに応じて硝酸ナトリウムに変換して供給することが行われた。一方で硝酸ナトリウムは爆薬の原料にもなり、このことが第一次世界大戦の長期化の一因となってしまった点は、ハーバー - ボッシュ法の影の部分である。

第一次世界大戦後はハーバー - ボッシュ法で製造した化学窒素肥料の利用が先進国に広まり、これに農地の拡大も相まって、世界の穀物生産量はますます増加した。ところが、第二次世界大戦終結後の 1960 年には、世界の農地面積はほぼ頭打ちになってしまった (Fig. 1-2)。これ以後は、ハーバー - ボッシュ法による化学窒素肥料の安定供給を前提としたうえでの、化学窒素肥料の大量投与による単収増加が焦点となり、1960 年代後半に実現したのが、半矮性と耐肥性を導入した穀物品種の開発による「緑の革命」(1-9) であった。「緑の革命」により発展途上国においても増収を達成することができたため、「緑の革命」開始時の 1960 年と比較して現在までに三大穀物における全世界の生産量は、コメとコムギで 4 倍、トウモロコシで 6 倍増加し (FAO, 2020/12/04)、世界人口は 1999 年の 60 億、2011 年の 70 億を経て、2023 年には 80 億人に到達する見込みである (Fig.1- 2)。しかし、この間に投与された化学窒素肥料の量は莫大であり、カリ肥料、リン肥料と比較しても突出している (Fig. 1-3)。このことが地球環境に様々な害を及ぼしている。

地球における本来の窒素循環では、生物窒素固定で生成された固定窒素は脱窒細菌の働きによって窒素分子に戻され、生物圏に存在する窒素量は安定しているはずであった。ところが、近年の農地への化学窒素肥料の投入量は年間 1 億 2000 万トンに達しており (Fig. 1-3)、この量は陸地において生物窒素固定で生成される固定窒素の量に匹敵し (1-33)、脱窒細菌の処理能力をはるかに超える。そのため、使用された化学窒素肥料の大部分が海洋生物圏に流れ込むとい

う窒素の動態を招いており、これが富栄養化をもたらしている（1-28）。「緑の革命」以前では北米やヨーロッパ周辺の海域でしか確認できていなかったアオコの繁茂やデッドゾーンの出現は、「緑の革命」以降世界の様々な海域で大規模に起こるようになってきている（1-27）。

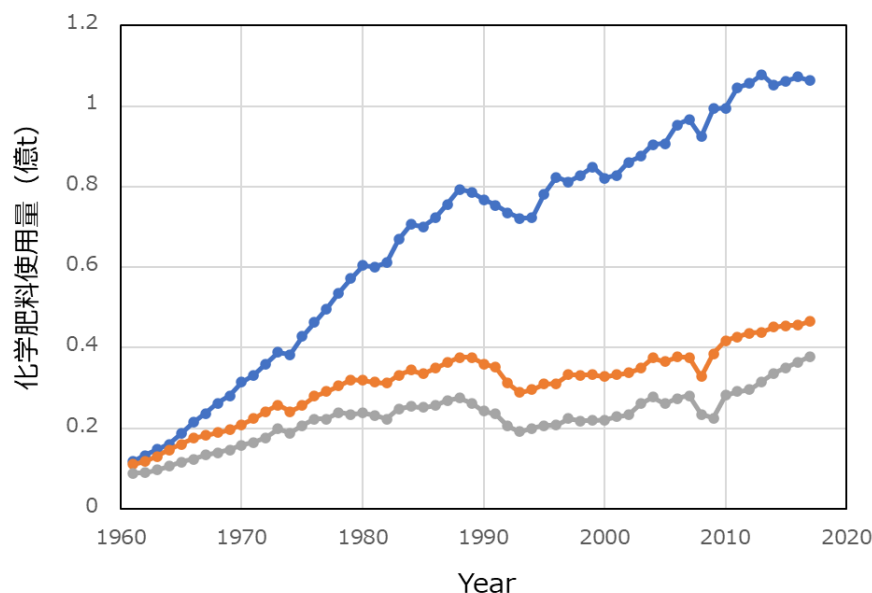
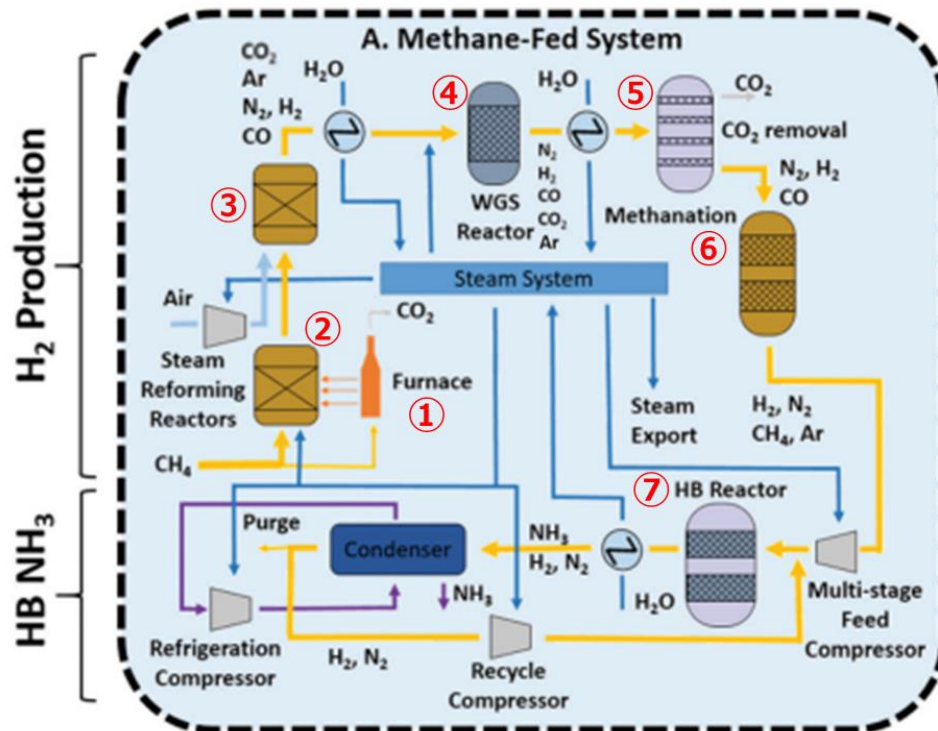


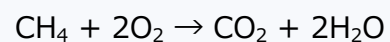
Fig. 1-3 緑の革命以降の化学肥料の種類別使用量の推移（FAOSTAT より作製）

●：化学窒素肥料、●：化学リン肥料、●：化学カリ肥料

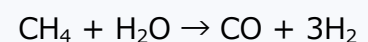
さらに、現在行われているアンモニア生産の工業プロセスにも、看過できない問題点が存在する。この工業プロセスは、窒素と水素を反応させるハーバー・ボッシュ法の基本プロセスと、天然ガス（メタン）の水蒸気改質による水素生産プロセスが直結した複合プロセスである（Fig. 1-4）。両プロセスを濃密にリンクさせることでエネルギー量論上のほぼ限界まで最適化が行われているにもかかわらず、化学窒素肥料 1 億 2000 万トン分のアンモニア製造プロセスで消費されるエネルギー量は世界全体のエネルギー消費量の 1%～2%に相当する（1-18）。これは全工業原料品目の中で最も多いが（1-16）、その 90%以上が原料の水素の生産部分に投入されていることはあまり知られていない（1-102）。また、水素生産プロセスで発生する CO₂も問題である。化学窒素肥料 1 億 2000 万トン分の水素生産プロセスで 4.5 億トンの CO₂が排出され（1-20）、これは CO₂ 排出量全体の 1.44%に及ぶ（1-18）。皮肉にも、穀物の増収を目的とした化学窒素肥料が、干ばつや水害といった異常気象を引き起こす地球温暖化の原因となり、穀物の減収要因の一端を担ってしまっているのである。



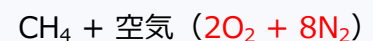
① 水蒸気改質に必要な高温の達成



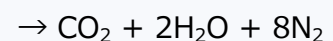
② 水素生成（水蒸気改質）



③ 水蒸気改質後のガスに残留するメタンの除去と



空気からの窒素の取り出し



④ CO の除去と水素生成

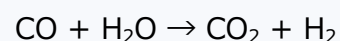


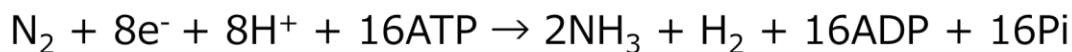
Fig. 1-4 現在の工業的アンモニア生産の概要（Smith et al., 2020 より改変）

このように化学窒素肥料は、多方面で環境負荷をもたらしており、化学窒素肥料の使用量削減が環境負荷の少ない食糧生産を達成する上で喫緊の課題であることは明確である。さらに、そう遠くない将来に訪れる化石燃料の枯渇により水蒸気改質法による水素生産が行えなくなる懸念も大きいものしかかっている。ある意味、100 年ほど前にクルックスが警告した時の状況から何も改善されていないとも言える。これに対して、研究者が長年注目してきたのが、生物窒素固定の利用である。

1-4 窒素固定細菌の生物窒素肥料としての利用

窒素固定細菌は、ニトロゲナーゼが触媒する下記の反応により、常温・常圧下で空中窒素を還元してアンモニアを作り出し、窒素源として利用することができる (1-34)。この能力を持つのは、ゲノムが解読されたバクテリアとアーキアの 15%であり、ユーカリアでは未だ見出されていない (1-35)。

ニトロゲナーゼ



常温・常圧

ニトロゲナーゼには、Mo ニトロゲナーゼ、Fe ニトロゲナーゼ、V ニトロゲナーゼの三種が存在するが、すべての窒素固定細菌が有し、環境中において生物窒素固定の大部分を担うのが Mo ニトロゲナーゼであるので (1-95)、今後はこの Mo ニトロゲナーゼにのみ着目する。ニトロゲナーゼは、実際に窒素を還元するヘテロ四量体のジニトロゲナーゼ ($[\text{NifD}]_2[\text{NifK}]_2$) と、還元反応に必要な電子をジニトロゲナーゼに送るホモ二量体のジニトロゲナーゼレダクターゼ ($[\text{NifH}]_2$) から構成される複合酵素である (Fig. 1-5)。ジニトロゲナーゼレダクターゼは、各サブユニットが ATP を結合した状態 ($[\text{NifH-ATP}]_2$) で内部の $[4\text{Fe-4S}]$ クラスターにフェレドキシンあるいはフラボドキシンから 1 個の電子を受け取る (干鯛)。これがジニトロゲナーゼと会合して電子をジニトロゲナーゼが保持する P クラスターに渡す。電子を渡した $[\text{NifH-ATP}]_2$ は ATP の加水分解を起こして $[\text{NifH-ADP}]_2$ となりジニトロゲナーゼから乖離し、その後 ADP と ATP の交換反応を起こして $[\text{NifH-ATP}]_2$ に戻る。一方、P クラスターに電子を受け取ったジニトロゲナーゼ内部では活性中心の FeMo コファクターに電子が移動する。4 個の電子が FeMo コファクター中の Fe 原子にヒドリド (H^-) として蓄積されると、直接 1 分子の窒素分子が割り込むように Fe 原子上に捕捉され、押し出される形で 1 分子の水素分子が放出される (Fig. 1-6)。その後、さらに 4 個の電子が FeMo コファクターに運ばれ、捕捉された窒素分子を還元し、2 分子のアンモニアが放出される。放出されたアンモニアは、細胞外へと一度拡散するが、 NH_4^+ 輸送体 AmtB によって再度細胞内に取り込まれ、窒素同化経路に入る (1-41)。

ニトロゲナーゼには、それを応用利用しようとする、以下のような難点が存在する。第 1 に、ニトロゲナーゼの酸素への感受性が非常に高い点である。特に $[\text{NifH}]_2$ は、わずか 45 秒空気にさらされるだけで活性が半減してしまう (1-43)。第 2 に、反応速度が非常に遅い点である。特に律速なのが $[\text{NifH-ADP}]_2$ が ADP と ATP の交換により $[\text{NifH-ATP}]_2$ に戻る反応で、その回転数は 6 s^{-1} であり (1-45)、1 分子の窒素を固定するのに最大 26 分間もの時間を要することもある (1-44)。このため、窒素固定細菌は菌体内の総タンパク質量の 10% におよぶニトロゲナーゼを生産し、反応の遅さを酵素量で補償している (1-46)。第 3 に、必要な ATP が多量である点である。1 分子の窒素を固定するのに理論上 16 分子が必要であるが、 $[\text{NifH-ATP}]_2$ からの電子の伝達ミスなどで ATP が浪費されることで、実際の生理状態では 20~30 分子の ATP を消費してしまう (1-42)。これらのことから、ニトロゲナーゼをバイオリアクターに組み立てることは実現できていない。

近年では、窒素固定能を有する植物の作出、あるいは根粒形成能を有する植物の作出が特筆される機会が多い。それぞれの詳細は、Mahmud ら (1-50) および Bloch ら (1-51) のレビューを参考にされたい。これらの植物が誕生すれば、化学窒素肥料に完全依存してしまっている現在の農業から大きく脱却することが期待される。しかし上述したニトロゲナーゼの特徴や、根粒形成システムの複雑さに阻まれ、実用化までにはまだ相当な期間が必要であると考えられる。そこで考えられているのが窒素固定細菌を生物窒素肥料として利用することである。窒素固定細菌の利用は、「緑の革命」に続いて、三大穀物（イネ、ムギ、トウモロコシ）で様々に目指されてきた (1-96)。その中でも、湛水によって嫌気条件が維持される水田土壌は、古くから畑土壌よりも生物窒素固定の活性が高いことが知られていたこともあり (1-53)、多くの研究が行われてきた (1-97)。また、コメを主食とする東南アジアの化学窒素肥料の消費量は今後とも増加することが予想されているため (1-94)、水田における生物窒素肥料の開発は化学窒素肥料削減に対する寄与が大きいと考えられる。

水田における生物窒素肥料としての利用が特に検討されているのは、従属栄養性の窒素固定細菌である。窒素固定細菌にはシアノバクテリアに代表される独立栄養性の窒素固定細菌も存在し、田面水の水面付近で光合成によって高い窒素固定活性を発揮することが知られている (1-54) が、固定窒素が吸収されるイネの根まで距離があることから、生物窒素肥料としての効果は限定的と考えられる。一方、*Azospirillum* 属や *Klebsiella* 属を始めとする従属栄養性の窒素固

定細菌は、根の表面や根圏と呼ばれる根の近傍において植物から供給される光合成産物を資化して生物窒素固定を行うことから、固定窒素を直接イネが利用することができ、生物窒素肥料としての高い効果が見込まれる（1-55）。

根圏は1904年にHiltnerによって提唱された、根の表層から数mm以内の土壌領域のことで（1-99）、バルク土壌とは異なる性質を3点有している。1点目は、炭素源濃度が比較的高濃度である点である。Fig. 1-7に示すように、植物は根から光合成産物の17-40%程度を（1-98）多種類の糖や有機酸（1-201）の形で分泌している。イネにおいては1日当たり15 mg-C/plant程度分泌されている（1-83）。2点目は、土壌細菌が高濃度で棲息している点である。根圏における土壌細菌の濃度は 10^9 - 10^{12} cells/g-soilと推定され、これはバルク土壌の100-1000倍に相当する（3-3）。特に根分泌炭素源の濃度が高い根の近傍ほど菌濃度も高く、根の表面の15%は土壌細菌によって覆われている（3-3）。また高栄養性の細菌の存在比もバルク土壌に比べて5倍程度高いとされている（1-201）。3点目は、比較的好気的な環境が存在する点である。根は通導組織になっており、葉で吸い込んだ空気が根から染み出ること、イネの場合は飽和溶解酸素量の10-30%程度の酸素が根圏に溶存している（1-202）。

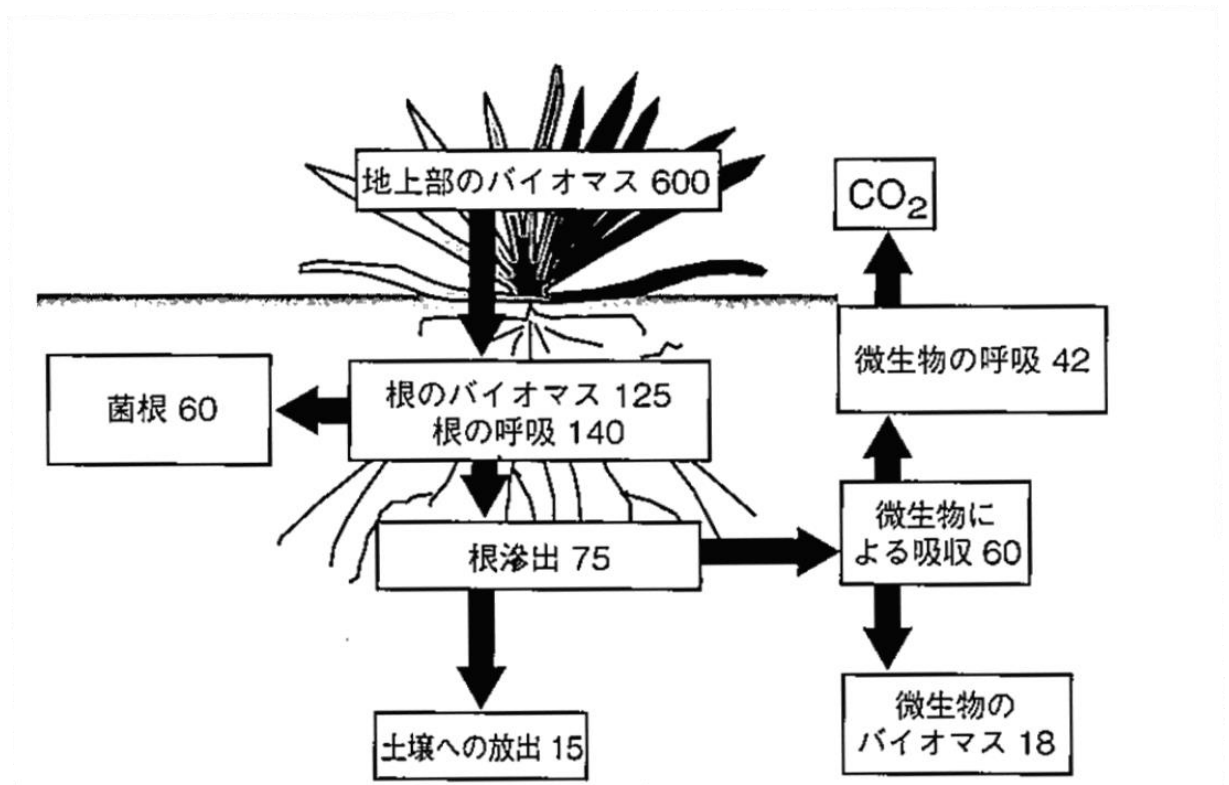


Fig. 1-7 炭素の純固定量を 1000 としたときの植物体内および根の滲出における炭素分配

(Kroon and Visser, 2008 より引用)

これまでに、圃場やポットによる栽培実験において、従属栄養性の窒素固定細菌の中でも特に *Azospirillum* 属細菌や *Azotobacter* 属細菌を発芽前の籾や幼苗時の根に接種することで、イネの籾収量が増加するとの報告が数多くされている（1-56~60）。すでにこれらの細菌の中には、生物肥料として上市されているものも存在し、収量を維持しつつ化学窒素肥料の使用量を削減することができたとの報告もある（1-61, 62）。しかし、使用時期によっては減収をもたらすことも報告されており（1-63）、安定した高収量が肝要である農業現場ではほとんど普及していない（化学窒素肥料の0.1%程度）のが現状である（1-64）。これらの研究において大きく見落とされているのが、生物窒素肥料として接種した窒素固定細菌が、根圏において、イネおよび土壌細菌叢と相互作用する中でどのような窒素固定を行うかという点である。これに関しては現在でもほとんど分かっていない。

1-5 稲作の追肥として窒素固定細菌を利用することへの当研究室の歩み

本節では、坂谷、釘宮、浜崎の修士論文の内容を要約する。

前節で、イネの生育初期に窒素固定細菌を接種して生物窒素肥料として利用する研究について記した。当研究室でも、研究開始時点では同様の手法をとることを考えた。使用する窒素固定細菌としては、窒素固定時に資化する炭素源の違いに着目して、糖を資化して嫌気条件で窒素固定を行う *Klebsiella oxytaca* NG13 と、有機酸を資化して微好気条件で窒素固定を行う *Azospirillum lipoferum* FS を選定した。イネは糖と有機酸を分泌するので、両株間で炭素源の競合が起こることなく、両株とも最大限の窒素固定を行ってくれると想定した。肥料効果を確認するためのイネとしては、人工気象機内で大量の株が栽培できるように、豊雪という品種のジベレリン合成能を欠損した矮性変異体（草丈 20 cm の超短秆）である豊雪矮性を用いた。

イネの生長過程を Fig. 1-8 (A) に示す。発芽から第 4 葉の出葉までは籾に蓄積された栄養で生長する。分けつ期に入ると、光合成に必要な葉緑素を生成するために土壤中の窒素を吸収するようになり、その速度は一気に上昇する (Fig. 1-8 (B))。窒素吸収速度は分けつ完了から幼穂形成開始までの間で最大となり、その後徐々に低下していき登熟期に入ると窒素吸収は止まる。この窒素吸収パターンに対応して、現在の稲作では、化学窒素肥料の投与を基肥と追肥の二回に分けて実施している。基肥は代掻き時に作土層に混ぜ込み、その量は分けつ完了までに吸収されつくすように調整される。分けつ完了から幼穂形成開始までの間、田は中干しされ、これにより土壤有機態窒素の無機化が促進されるのでイネはこの窒素を吸収する。また、分けつ期終盤以降イネは大量の炭素源を根から分泌するようになるので、根圏に棲息する窒素固定細菌がもたらす固定窒素をも吸収していく。その後、幼穂形成開始から出穂までの間に追肥を行う。追肥を行うか行わないかで、最終的な籾の形成数に 2 割の違いが現れる。現行の稲作では、このようにして収穫量／施肥量が最大になるように管理されている。

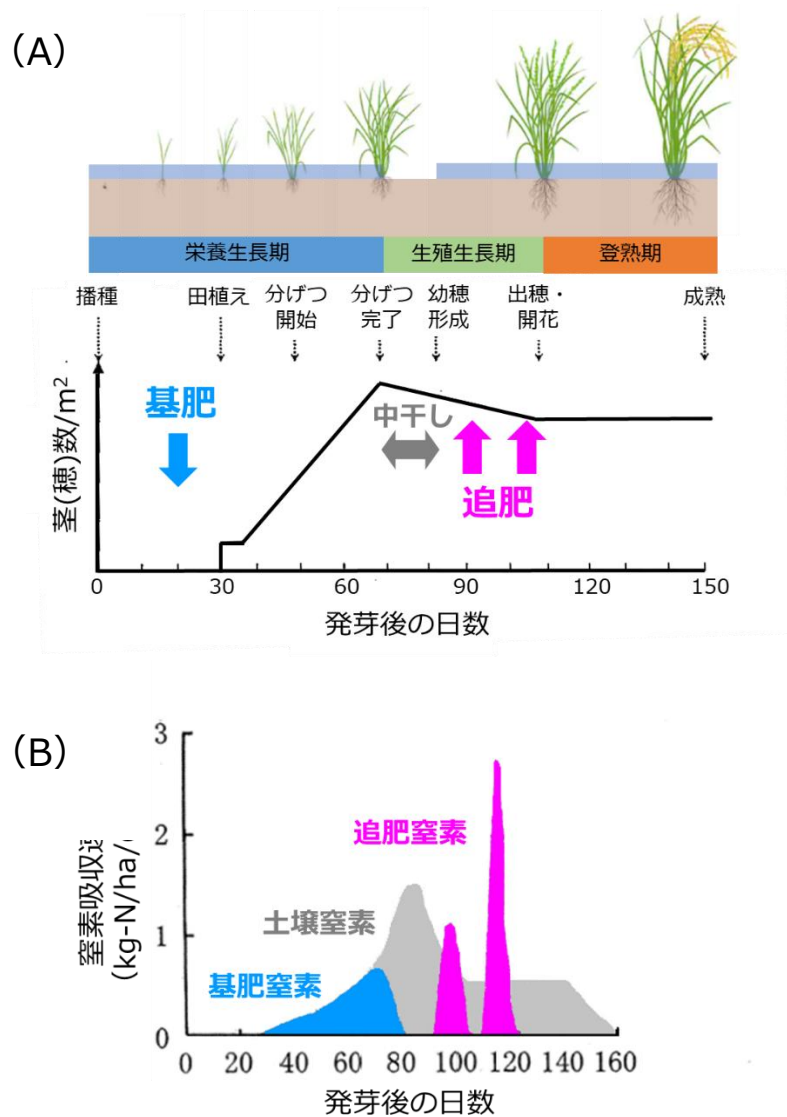


Fig. 1-8 イネの生育過程の概要 (A) (前, 2008 より改変)、およびイネの窒素吸収速度と吸収窒素の由来 (B) (庄子・前, 1984 より改変)

窒素固定細菌を生物窒素肥料として活用する上で考慮しなければならない点は、窒素固定細菌は、細胞外に十分量の炭素源が存在して ATP と電子の生成を十分に行え、かつ細胞外に吸収可能な窒素源が存在しない条件の時のみしか窒素固定を行なわない点である。(この制御は、ニトロゲナーゼ関連遺伝子の発現調節やニトロゲナーゼの翻訳後修飾により行われており、その詳細は Batista (2019) の総説を参照されたい (1-84)。) となると、田植え時に窒素固定細菌の野生株を接種しても、幼若イネからの炭素源分泌は少量で、基肥が窒素源となる環境では、野生株は窒素固定を行うことができない。そこで、当研究室では NG13 株と FS 株を遺伝子組換えにより改変し、窒素源存在時にも窒素固定

を行う改良株 *K. oxytoca* R16 と *A. lipoferum* TA1 を作出した。両改良株は 20 mM の塩化アンモニウム存在下でも窒素固定を行う。この R16 株と TA1 株を、1 mM 硝酸アンモニウムを含む水耕液を吸収させたバーミキュライトでポット栽培する豊雪矮性に混合接種して、両株を接種しないイネと比較して籾収量に変化が生じるかを観察した。すると、田植え時での接種では籾収量に変化がなかったものの、分けつ期が完了した時点で接種した場合には籾収量の増加が認められた（データは示さない?）。すなわち、窒素固定細菌を生物窒素肥料として機能させるには、根分泌炭素源の量が大きく影響することが示唆された。そこで方針を転換し、イネから供給される炭素源が大量となる追肥時期に窒素固定細菌を接種することで、生物窒素肥料としてどの程度機能するかを検討することとした。

最初に、水耕液を吸収させたロックファイバীবロックで豊雪矮性をポット栽培する際の収穫量／施肥量に関する基礎データを得るために、基肥として 3.6 mmol の硝酸アンモニウムを与え、その後 0, 0.5, 1.5, 3 mmol の硝酸アンモニウムを全生育期間の中で複数回の均等割りで投与し、穂数や収穫籾重量を計測した（Table 1-1）。投与窒素量を増加した際の変化は、籾 1 粒の重量や窒素含量に表れるのではなく、結実籾数に表れた。そして、収穫量／施肥量と千粒重は、4.1 mmol 投与と 5.1 mmol 投与でほぼ等しく、6.6 mmol 投与の値はそれらのものより劣っていた。6.6 mmol 投与は、本来の豊雪ならば倒伏してしまうような過剰施肥にあたるのであろう。さらに、5.1 mmol 投与では、推定タンパク質含量が 8.6% と正常値（7%～8%）よりも大きく、過剰分けつの傾向も示した。これより、1.5 mmol 以上の追肥は過剰施肥であると判断した。

Table 1-1 硝酸アンモニウムを追肥として投与した時の肥効（誰の結果?）

投与窒素総量 (mmol)	3.6 (0)	4.1 (0.5)	5.1 (1.5)	6.6 (3.0)
穂数	12.0	13.8	16.5	18.5
収穫量 (g)	3.83	4.82	6.31	6.21
収穫量／施肥量	1.06	1.18	1.23	0.94
千粒重 (g)	24.8	23.9	23.7	22.2
籾窒素含量 (%)	1.27	1.21	1.44	1.60
推定タンパク質含量 (%)	7.6	7.2	8.6	9.5

投与窒素総量の（ ）内は、追肥相当の投与窒素量を表す。籾窒素含量からタンパク質含量を推定する係数は 5.95 を用いた。なお、ポット栽培なので、基肥として投与した硝酸アンモニウムは、水田のように溶脱することは起きない。

この結果に基づき、基肥 3.6 mmol 硝酸アンモニウム（水耕液での濃度は 3 mM）で栽培を開始して分げつ完了まで育てた豊雪矮性に、追肥として 0.54 mmol 硝酸アンモニウムを投与したものと、R16 株と TA1 株を混合接種したものの収穫量を比較した（Fig. 1-9）。本栽培はポット栽培であり基肥の溶脱が起きないので、追肥時期でも基肥が残存している可能性がある。そのため、R16 株と TA1 株を用いた。さらに、窒素固定細菌のみを接種したのでは、イネ根が分泌する炭素源を独占して資化してしまうため、生物窒素肥料としての効果を正當に評価することができない。そこで、水田土壌から分離した非窒素固定細菌 11 株から様々に選んだ 6 株を組み合わせることで 15 種類の模擬根圏細菌叢を構築することとした。分げつ期に各細菌を 10^9 cells/mL ずつ接種して模擬根圏細菌叢を構築したうえで、追肥時期に R16 株と TA1 株を 10^8 cells/mL ずつ接種した。これにより、ほぼ 100 倍量の非窒素固定細菌とイネ根分泌炭素源を奪い合う中での生物窒素肥料としての効果を観察することになる。

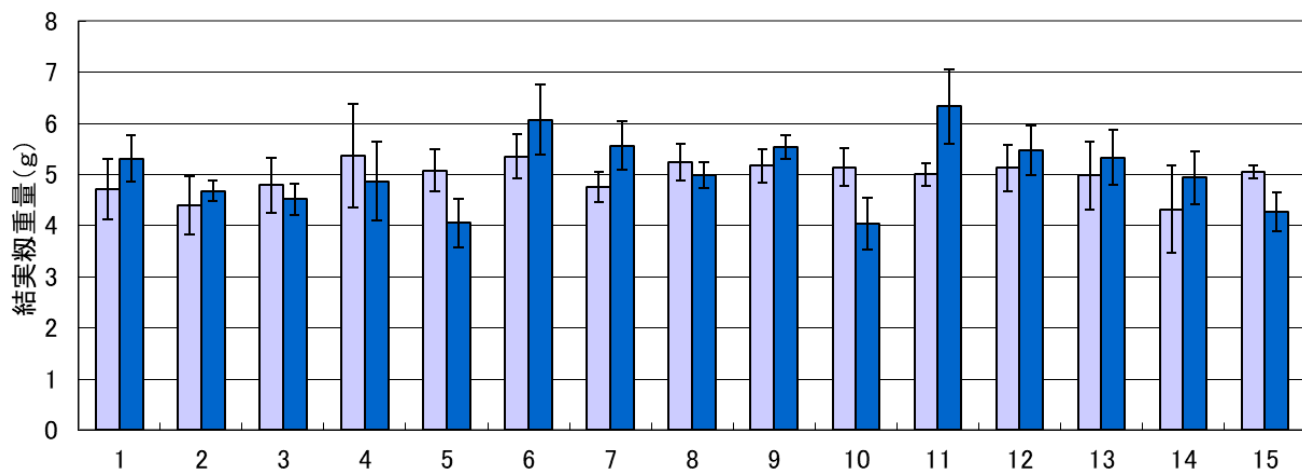


Fig. 1-9 15 種類の模擬根圏細菌叢を構築した豊雪矮性の結実収重量（釘宮修論）

試験は 5 連で行い、エラーバーは標準誤差を示す。

■：追肥として 0.54 mmol 硝酸アンモニウムを投与した場合

■：追肥として R16 株と TA1 株を 10^8 cells/mL（濃度でいいの？）接種した場合

その結果、大部分の模擬根圏土壌細菌叢において、硝酸アンモニウムを追肥したイネと窒素固定細菌を接種したイネのどちらも 4.8 g 前後の収穫量となり、両者の違いに有意差は認められなかった。すなわち、追肥の段階では、硝酸アンモニウムを生物窒素肥料で完全に代替しうることが確認できた。

なお、模擬根圏細菌叢 1, 6, 11 では R16 株と TA1 株接種時の籾収量は 6 g 前後であり、他の細菌叢での収量より明確に多い。一方、模擬根圏細菌叢 5, 10, 15 では R16 株と TA1 株接種時の籾収量は 4 g 前後であり、他の細菌叢での収量より明確に少ない。模擬根圏土壌細菌叢 1, 6, 11 には *Pseudomonas* 属細菌が存在しており、模擬根圏土壌細菌叢 5, 10, 15 には *Burkholderia* 属細菌（この細菌は窒素固定を行うことがのちに判明した。）が存在している。これらの細菌の共存により、接種した窒素固定細菌の生物窒素肥料としての機能が増加したり減少したりする可能性が示唆された。このことに関する解析も本研究室で行われてきたが、これに関しては記さない。

さらに、水田土壌でポット栽培するイネでも生物窒素肥料が追肥効果を示すかを調べた (Fig. 1-10)。遺伝子組換えで作出した R16 株と TA1 株を農業現場で利用することは不可能なので、この実験では野生株である NG13 株と FS 株を用いた。水田土壌は、化成肥料を基肥として施肥して田植えをして約 2 カ月経過した水田から採取した。この土壌 1 kg に豊雪矮性を田植えし、分けつが完了したことを確認した時点で NG13 株と FS 株を土壌 1 g 当たり 5×10^7 cells ずつ接種した。この実験では、化成肥料をどの程度追肥するのが適切であるかを判断できなかったため、追肥を行わない栽培での籾収量と、生物窒素肥料を追肥した栽培での籾収量を比較することで、肥料効果を評価することとした。その結果、追肥しない栽培の籾収量は 2.28 ± 0.10 g、生物窒素肥料を追肥した栽培の籾収量は 2.72 ± 0.19 g となり、その違いには有意差があった。そして、追肥による収量増加分は 2 割弱 $[(2.72-2.28)/2.72=0.161]$ となった。この値は、追肥の有無で収量に 2 割程度の違いが現れることを基に考えると、順当な追肥効果であると言える。さらに、土壌中に存在する細菌叢の密度と接種した窒素固定細菌の定着量を調べたところ、細菌叢は 10^9 cells/g で形成されており、その中の *Azospirillum* 属細菌の存在量は 10^4 cells/g であったのに対し *Klebsiella* 属細菌は検出限界以下でしか存在していなかった。一方、NG13 株と FS 株を接種した場合は、どちらの株も 10^5 cells/g のレベルで接種後 5 週間にわたって定着していた (Table 1-2)。

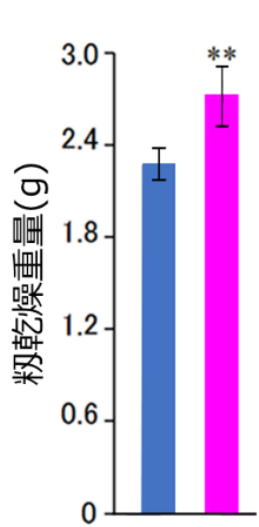


Fig. 1-10 水田土壌で栽培する豊雪矮性の窒素固定細菌の接種による結実粒重量の変化
(浜崎修論)

試験は 6 連で行い、エラーバーは標準誤差を示す。** : $p < 0.01$

■ : 追肥をしない場合

■ : 追肥として NG13 株と FS 株を 5×10^7 cells/g で接種した場合

Table 1-2 NG13 株と FS 株接種時、および無接種時の水田土壌における両株の存在量
(10^4 cells/g) (浜崎修論)

	接種		無接種	
	NG13	FS	NG13	FS
1週間後	10	30	N. D.	1
3週間後	4	20	N. D.	0.9
5週間後	0.8	7	N. D.	0.7

以上のように、本研究室では、稲作の追肥を生物窒素肥料で代替しうることが確認されていた。しかし、NG13 株と FS 株の混合接種によって、イネ根圏細菌叢全体が示す窒素固定活性がどのように上昇するのかの解析はまだ行われていなかった。

そこで私は、追肥として接種した NG13 株と FS 株が、イネ根圏においてイネや水田土壌細菌叢と相互作用すること、ならびに両株同士で相互作用することで窒素固定活性にどのような動態変化を起こすのかの解明を目指して、修士課程から研究を行ってきた。細菌間での相互作用に関しては、実際のイネ根圏を

対象にしたシステムバイオロジータ解析で明らかにできるかもしれない。しかし、各窒素固定細菌が示す窒素固定活性の経時的動態を正確に解析するには、その窒素固定細菌を試験管培養し、検出感度が最も高いアセチレン還元法（1-206）によって測定するほかない。そこで、私の修士課程では、NG13 株を用いて、より正確な窒素固定活性の測定のための新たなアセチレン還元法の開発を行った。それがアセチレンとの 4 時間のみの接触による測定法（4-h ARA）である。その詳細については第 2 章で述べる。

また、*K. oxytoca* は従来嫌気条件でのみ窒素固定を行うと考えられていたが（1-69）、好気的環境も有するイネ根圏に接種することで肥効を発揮した点を考慮すると、このことには疑問が生じる。そこで、嫌気的あるいは好気的液体培養で NG13 株が示す窒素固定活性を 4-h ARA で測定し、両条件で菌体増殖や発揮される窒素固定活性の経時的動態に違いが無いことを明らかにした。NG13 株は定説に反し、窒素固定を行う際の酸素濃度の許容範囲が嫌気から微好気までと広いことが分かった（Fig. 1-11）。

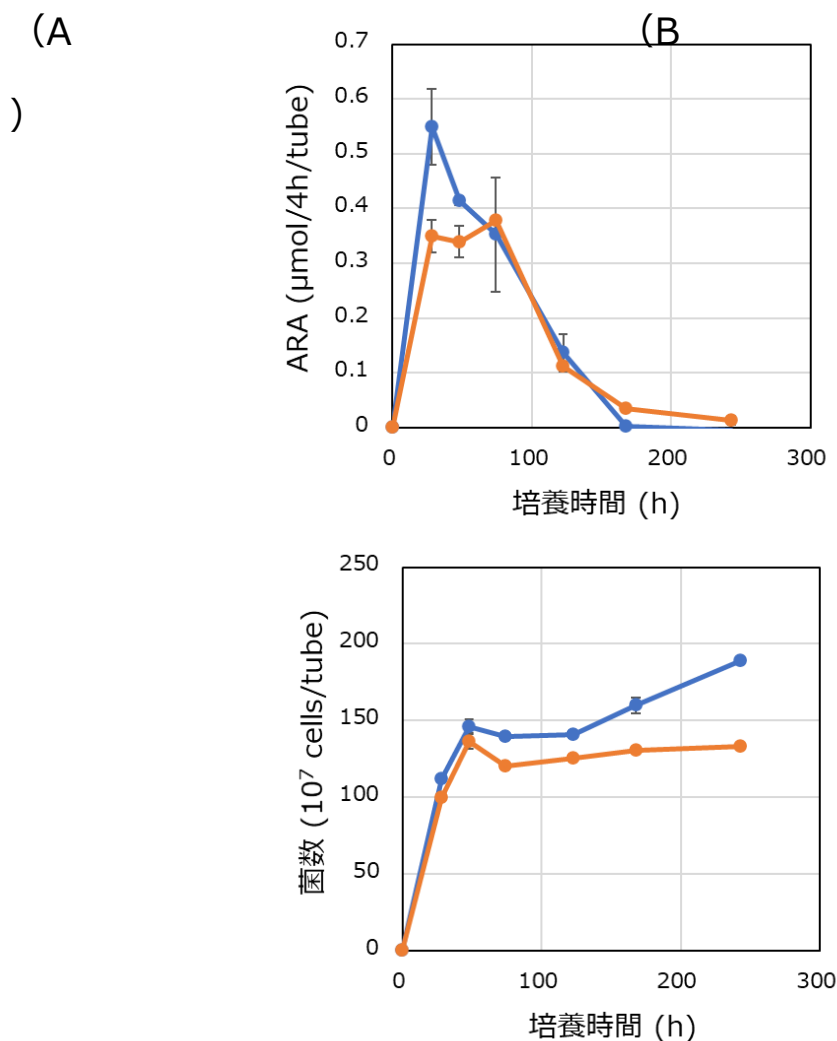


Fig. 1-11 好氣的あるいは嫌氣的条件における Rennie 培地で液体バッチ培養時の NG13 株の窒素固

定活性 (A)、および菌体増殖 (B) (吉留修論)

試験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を示す。

- : 好氣的条件 (気相置換無し)
- : 嫌氣的条件 (気相 N_2 置換)

さらに、イネ根圏環境を考え、従来の高濃度の炭素源を含む培地を用いたバッチ培養から、炭素源濃度を低めた培地に毎日炭素源を添加し続ける Fed-バッチ培養に変更し、NG13 株の窒素固定活性の経時動態が全く異なる様相を示すことを明らかにした (Fig. 1-12)。これにより、博士課程で、イネ根圏環境の再現性の高い試験管培養系を開発することへのインセンティブを得ることができた。

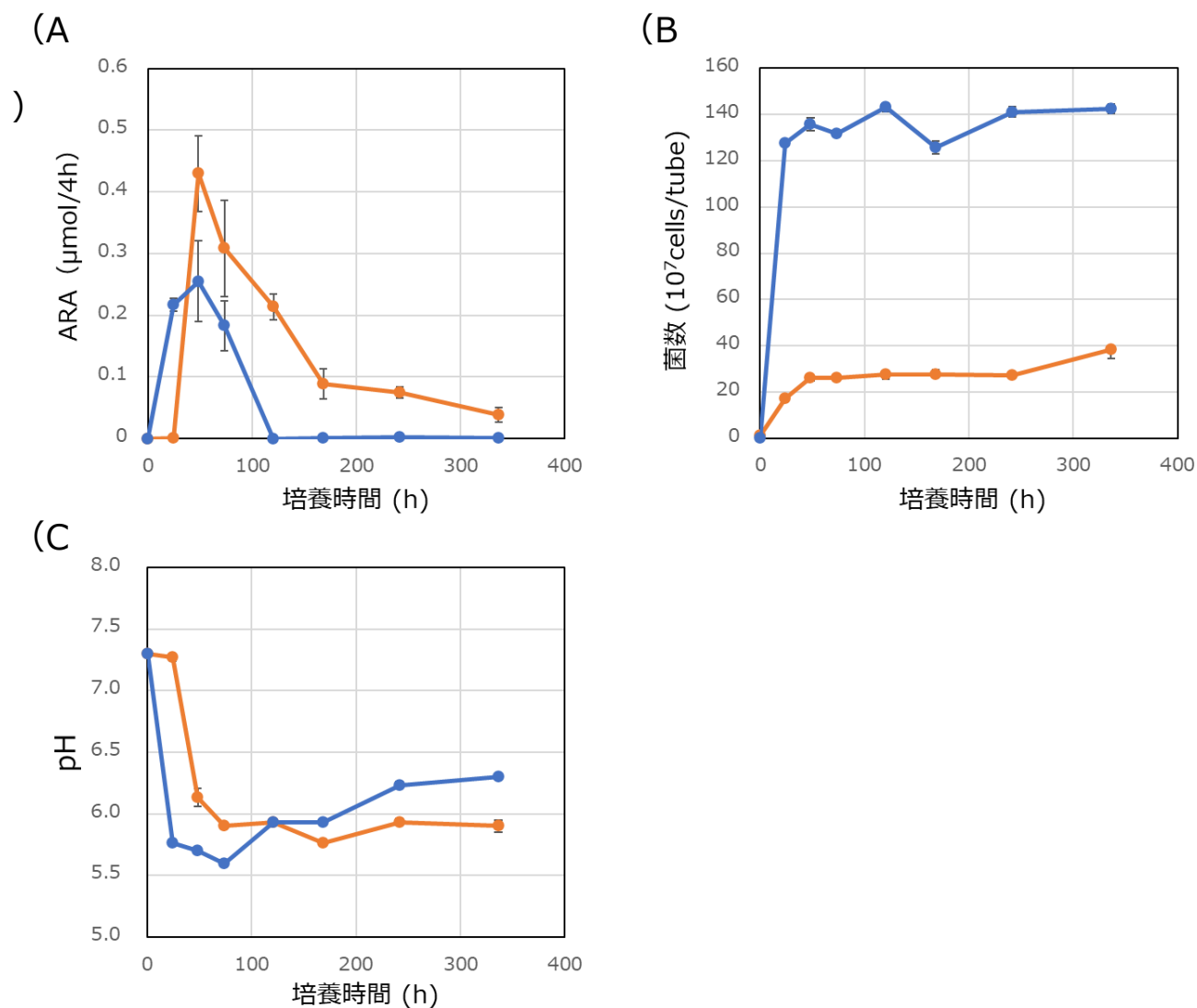


Fig. 1-12 高濃度炭素源培地を使用したバッチ培養、および低濃度炭素源培地を使用した Fed-バッチ培養時における NG13 株の窒素固定活性 (A)、菌体増殖 (B)、および pH (C) の経時的変化 (吉留修論)

試験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を示す。

- : 高濃度炭素源培地 (改変 Rennie 培地) を使用したバッチ培養
- : 低濃度炭素源培地 (炭素源量 1/10 改変 Rennie 培地) を使用した Fed-バッチ培養

1-6 本研究の目的と本論文の構成

私の研究の最終目標は、イネ栽培の追肥として使用できる高活性型の生物窒素肥料を開発することで、環境負荷の少ない稲作を実現することである。本研究室における過去の研究で、NG13 株と FS 株の混合接種がその任に堪えるものであることが示されていたので、まずは、その肥料効果の根幹が NG13 株と FS 株の行う窒素固定活性にあることを明らかにすることを目指した。そのためには、イネ根圏の様々な性質を再現した試験管培養系の構築が必要である。イネ根圏では、イネが日中に光合成した産物の一部が毎日根から分泌されている。この現象は Fed-バッチ培養系で再現しうる。しかし水田には湛水した水の鋤床層からの漏水による日減水深 20~30 mm の垂直方向の流れがあり、これにより根分泌炭素源やそれを細菌が代謝した産物が流失していくことも考慮しなければならない。根圏土壌細菌叢の中には糖を資化して有機酸を生成する細菌が存在することは容易に想像できる。有機酸による pH の低下は細菌の増殖抑制 (1-79)、さらには生物窒素固定の活性も抑制するため (1-80)、イネ根圏における生物窒素固定の動態を再現する上で、物質の除去は非常に重要である。となると、添加する炭素源や細菌の代謝産物が蓄積し続ける Fed-バッチ培養系では不完全であり、試験管ケモスタット培養系を確立する必要がある。また、イネ根圏では多くの細菌が根や土壌粒子に定着している。窒素固定細菌の中には定着状態か浮遊状態かで *nif* 遺伝子の発現が異なるだけでなく (1-81)、定着しバイオフィーム状態になることで窒素固定活性が増大するものが存在する (1-82)。この点も考慮に加えると、確立すべき試験管ケモスタット培養系は、細菌定着用の基材を導入した試験管ケモスタット培養系ということになる。そこでその実現とともに、その培養系を用いて構築した根圏細菌叢に NG13 株と FS 株を接種した際の窒素固定活性の動態解析を目指した。

以上に加えて、水田土壌から単離できる様々な窒素固定細菌の中から炭素源資化性の異なるもの同士の組み合わせの中に、NG13 株と FS 株の組合せ以上の高い窒素固定活性を発揮するものがないかの探索を目指した。これまでに多種多様な窒素固定細菌が単離されてきた。しかし、私の知る限り窒素固定を行う際の炭素源資化性に着目し、それが異なる複数の窒素固定細菌を組み合わせることで相加的かそれ以上の生物窒素固定活性をもたらすような結果はこれまでに報告されていない。本探索を行うことで、単独の窒素固定細菌だけでは達成し得ない、高い窒素固定活性を有する生物窒素肥料の開発に多大に貢献できると考える。

本論文の構成は以下の通りである。まず、第 2 章では各種培養条件を検討し、イネ根圏環境型試験管培養系（イネ培養系）の構築、ならびに水田土壌細菌叢の試験管内での再現を行った。第 3 章では、イネ培養系内に構築された水田土壌細菌叢存在下における NG13 株と FS 株の動態の解析を行い、イネの追肥部分の生物窒素肥料としての機能について検証した。第 4 章では、イネ培養系を用いてイネ根圏で想定される C 源資化性の異なる NG13 株と FS 株の間の相互作用について解析した。第 5 章ではイネ培養系に構築された高い生物窒素固定活性を有する水田土壌細菌叢から、窒素固定細菌の単離・同定を行い、NG13 株、FS 株の組合せ以上に高い生物窒素固定活性を有する窒素固定細菌の組合せの探索を行った。最後の第 6 章でまとめを行った。