

## マメ科植物と根粒菌の共生 —基礎と応用—

菅沼教生 (愛知教育大学理科教育講座)

### 1. はじめに

窒素は、タンパク質や核酸の骨格を構成する生物に欠くことのできない重要な元素である。植物は、土壌中に含まれる無機窒素化合物である硝酸イオンやアンモニアを吸収・同化することで必要な窒素を獲得する。ところが、私たち人類をはじめ動物は、無機窒素化合物を同化することができない。植物が吸収・同化して合成された窒素を含む有機化合物を、体内に摂取し分解することで窒素を獲得する。植物の無機窒素化合物を吸収・同化する機能は、太陽エネルギーを利用して炭素を同化する光合成機能と同様に、人類の生存を支える大切な役割を果たしている。

植物が吸収・同化する無機窒素化合物は、自然界の土壌に無尽蔵に存在するわけではない。大気中の窒素ガスが、様々な作用によりアンモニアに変換され、地表に取り入れられる(窒素固定作用)。取り入れられたアンモニアは、硝化細菌の作用により硝酸イオンに変換される(硝化作用)。アンモニアは生物に害作用があり、多くの植物は変換された硝酸イオンを好んで吸収する。さらに、土壌中で変換された硝酸イオンは、脱窒細菌の作用により、窒素ガスに変換され大気中に放出される(脱窒作用)。植物は、この循環の過程で生じた無機窒素化合物を利用している。

作物を栽培し収穫すると、土壌中の無機窒素化合物は、やがて枯渇する。定住して、作物を持続的に栽培し、食糧を得るためには、土壌に窒素肥料を施す必要がある。さらに、作物の収量は土壌中の窒素の量に依存することから、収量を確保するためには、多量の窒素肥料が必要になる。植物を用いた緑肥や動物の糞尿等が、長い間肥料として利用されてきたが、二十世紀初頭に窒素ガスから人工的にアンモニアを合成するハーバー・ボッシュ法が開発されると、作物生産は飛躍的に増大し、食糧を安定して確保できるようになった。人類の生活にとって、ハーバーとボッシュの功績は極めて多大である。

ところが、時代の移り変わりとともに、新たな課題が生まれてきている。人工的に窒素肥料を生産するためには、化石エネルギーが利用される。化石エネルギーは無限ではなく、かつ、化石エネルギーの利用による地球環境汚染が叫ばれている。また、作物の硝酸イオンの利用効率は、約50%程度であり、施肥した硝酸イオンの約半分は、地下水、河川、海洋の汚染を引き起こす一因になっている。オイルショック、地球環境問題、ごく最近では、脱炭素といった課題に対して、生物による窒素ガスをアンモニアに変換する生物学的窒素固定が注目を集めてきている。ここでは、私たちのマメ科植物と根粒菌による共生窒素固定研究の成果と窒素固定能力の強化に向けた取り組みを紹介する。

### 2. 空中窒素を固定する生物

ある種の生物は、窒素固定酵素ニトロゲナーゼの働きによって大気中の窒素ガスをアンモニアに変換する能力を有している。原始生命は、約38億年前に海中で誕生したと言われている。そして、約35億年前に、熱水に生息していた好熱性メタン菌が窒素固定を行っていたことが確認されている。生物が窒素固定を始めた歴史は古いが、窒素固定能力を有する生物は、メタン菌が属する古細菌の系統及細菌、放線菌、ラン藻が属する真正細菌の系統に限られており、植物や動物のような真核生物には見られない。

ところが、植物の中には、これらの微生物と共生し、微生物が固定した窒素を生育に利用しているも

のがある。微生物が植物に侵入しても病気にならず、仲良く共存する植物と微生物の関係を共生という。マメ科植物と根粒菌の共生は、植物と微生物の代表的な共生関係である。マメ科植物は、根粒菌が大気中の窒素ガスから固定した窒素を生育のために利用することができるため、窒素肥料がなくても旺盛に成長することができる。他には、ハンノキやグミのような木本の植物が放線菌と、水生のシダ植物がラン藻と共生して、微生物から窒素を得ている例が知られている。これら窒素固定生物は、自身の生育に必要な窒素を大気から獲得するのみならず、地球で生活する生物に必要な窒素を大気から地表に供給する重要な役割を果たしている。

ちなみに、植物が土壌中の微生物と共生するのは、特別な現象ではない。多くの植物は、糸状菌（カビ）と共生関係を営む。糸状菌は、糸状の菌糸で生活する微生物で、細菌や放線菌と異なり、植物と同じ仲間の真核生物である。菌糸が植物の根の表面を覆う、あるいは、菌糸が根の細胞内に侵入して、共生する。菌糸が共生した根を菌根、共生する菌を菌根菌という。

菌根菌は、およそ4億年前の原始的なシダ類の根の化石に発見されている。この化石の年代と生命が海から陸上に進出した年代が重なることから、根が貧弱だった原始的な植物が、陸上で水分を確保するために、糸状菌との共生を始めたと考えられている。原始的な植物が獲得した糸状菌との共生機能は、進化の過程で原始的な植物から誕生した様々な陸上植物に受け継がれ、現在では、約80%の植物が菌根菌と共生して生活している。

興味深いことに、菌根共生と根粒共生に共通の遺伝子が働いていることが明らかにされた。このことは、マメ科植物は、もともと備わっていた菌根共生に必要な遺伝子を活用することで、根粒菌との共生機能を獲得したことを物語っている。

### 3. マメ科植物と根粒菌による窒素固定作用

中世ヨーロッパでは、耕地を三つに分割し、春蒔き穀物、秋蒔き穀物、休耕地とし、これらを順次繰り返す三圃式農法が取り入れられていた。そして、この農法は、休耕地にマメ科の牧草を植えることで地力を回復させる方式へと発展していった。これは、すでに当時からマメ科植物には土地を肥沃にする能力があることが経験的に知られていたことを示している。その後、19世紀末になって、マメ科植物が土壌細菌の一種である根粒菌と共生すると、根に根粒と呼ばれるこぶ状の組織が形成され、大気中の窒素が固定されることが科学的な実験によって明らかにされた。

マメ科植物と根粒菌の共生は、大別すると、根粒という器官の形成と窒素固定という機能の発現の二つのプロセスから成り立つ。さらに、共生現象の生物学的に興味深い点は、これらのプロセスが植物と根粒菌の相互作用によって成立する点である。人為的に遺伝子に変異を引き起こした変異体を調べると、根粒が形成されない、あるいは、根粒は形成されても窒素固定能力に異常が見られる変異体が、植物と根粒菌のそれぞれから見つかる。

加えて、多くの根粒菌は、単独で生活する時には、窒素固定を行わない。宿主であるマメ科植物に共生してはじめて窒素固定能力を発揮する。これは、マメ科植物と根粒菌の共生にだけ見られる特徴的な現象である。マメ科以外の一部の植物と放線菌との共生においても、マメ科植物と根粒菌の共生と同様に、根粒が形成され窒素固定が行われるが、放線菌は単独でも窒素固定能力を発揮する。

### 4. 変異体とミヤコグサ

根粒は形成されるが形成された根粒が窒素固定活性を示さないエンドウの変異体に出会ったことから、共生した根粒菌の窒素固定能力をコントロールする宿主植物遺伝子に興味を持ち、研究を進めてきた。この変異体は、根粒菌の窒素固定能力をコントロールする植物の遺伝子に変異したために、窒素固

定能力が発揮されない。変異体の原因遺伝子を突き止めれば、宿主植物が共生した根粒菌の窒素固定能力をコントロールする仕組みを明らかにすることができる。

一般に、変異体の原因遺伝子は、子孫ができるときに起こる染色体の組み換えの頻度を調べ、染色体上の位置を大まかに特定し、その周辺に予測される遺伝子の塩基配列を解析することで、変異した遺伝子を同定する手法によって明らかにされる。ところが、そのためには、植物が保持している全染色体（ゲノム）の塩基配列の情報が必要になる。ゲノムの塩基配列を決定する技術は、現在格段に進歩したが、数十年前は容易ではなかった。とりわけ、エンドウは、保持しているゲノムの情報が膨大で、一般的な手法を用いて変異体の原因遺伝子を明らかにすることは不可能であった。

そんな時、扱いやすいモデルとなる生物を選定し、生物の基本的なしくみを遺伝子レベルで解明しようとするプロジェクトが様々な生物で始まった。高等植物では、シロイヌナズナがモデル植物に選定され、世界中の研究者が協力して、植物の基盤をなす機能の解明が進められることとなった。しかし、シロイヌナズナはアブラナ科の植物で、根粒菌と共生しない。共生の研究者にとっては、マメ科のモデルとなる植物が求められた。

マメ科のモデル植物として選定されたのが、ミヤコグサとタルウマゴヤシである。両者ともに、マメ科植物の中では最もゲノムサイズが小さく、変異した遺伝子を見つけるのに好適な植物である。我が国では、ミヤコグサが在来種であることから、ミヤコグサがモデルマメ科植物として取り上げられ、ゲノムの塩基配列情報の解析をはじめとするミヤコグサを用いた共生研究の大きな潮流が生まれた。

## 5. これまでの研究の成果

研究材料をエンドウからミヤコグサに変更し、根粒は形成されるが形成された根粒の窒素固定能力に異常が見られるミヤコグサ変異体を用いて、共生した根粒菌の窒素固定能力をコントロールする宿主植物遺伝子の解明に取り組んだ。その結果、*SST1*、*FEN1*、*SEN1*、*SYP71* の4種類の遺伝子の同定に関わることができた。このうちの2つの遺伝子 *FEN1* と *SEN1* を紹介する。

*FEN1* 遺伝子は、遺伝子の変異すると、根粒菌が共生した根粒の細胞が肥大しないという特徴が見られることから、機能が解明される以前に命名された遺伝子の名称である。ミヤコグサのゲノムの塩基配列の情報に基づいて、変異体における変異した遺伝子を染色体の位置から特定した。さらに、特定した遺伝子の塩基配列とこれまでに知られている遺伝子の塩基配列とを比較し、予想される遺伝子の機能を解析した結果、*FEN1* 遺伝子はホモクエン酸という物質を合成する酵素タンパク質の遺伝子であることが判明した。

ホモクエン酸は、窒素固定酵素に組み込まれる化合物で、ホモクエン酸合成酵素は、本来、窒素固定酵素を合成する根粒菌側に備わっている遺伝子である。ところが、多くの根粒菌では、この酵素の遺伝子が欠落していた。根粒菌は、ホモクエン酸を自身で作り出すことができないために、活性のある窒素固定酵素を合成することができない。そこで、宿主である植物がホモクエン酸を合成し、合成したホモクエン酸を共生した根粒菌に供給することで、活性のある窒素固定酵素を合成するといった、植物と根粒菌との緊密なやりとりが明らかになった。

根粒菌にホモクエン酸を合成する遺伝子が見られないのは、植物に共生するうちに、根粒菌が窒素を固定して植物のために働くのが面倒になったからかも知れない。しかし、宿主である植物は、それでは困るので、根粒菌で欠落した遺伝子を自ら生み出し、根粒菌を働かせているのだろう。この発見により、共生関係の新たな一面が表出されることとなった。

*SEN1* 遺伝子は、変異体に形成された根粒に窒素固定活性がまったく検出されないことから、共生する根粒菌がじっとして何もしない根粒という意味合いから付けられた名称である。こちらの遺伝子は、変

異した遺伝子を明らかにすることができたが、最終的に機能を解明するに至っていない。他のグループの研究によれば、窒素固定酵素に組み込まれる鉄イオンを宿主植物から共生した根粒菌に輸送する役割を果たすと考えられている。

研究材料として扱いやすいミヤコグサのようなモデル植物を使うことで、研究は進展する。そして、モデル植物を用いた研究によって明らかになった成果を扱いが難しい研究材料に活かすことが、モデル植物を用いた研究の意義でもある。遺伝子研究の出発点となった、根粒は形成されるが形成された根粒が窒素固定活性を示さないエンドウ変異体に再び立ち返ったところ、変異した遺伝子はミヤコグサの *SEN1* 遺伝子の仲間であることが最近明らかになった。遠回りしたようだが、ミヤコグサを用いたことで、エンドウの原因遺伝子にたどり着くことができた。

## 6. 今後の展望

生物的窒素固定は、化石エネルギーに依存せず、環境にやさしい、利用価値の高い生物的機能である。マメ科植物を緑肥として利用するのみならず、マメ科以外の植物に根粒菌との共生能力を獲得させる、また、マメ科植物の窒素固定能力を強化する等、生物的窒素固定機能の活用を目指した取り組みも進められている。

マメ科植物と根粒菌との共生は、もともと植物が保有していた糸状菌との共生に必要な遺伝子を活用することで誕生したことを述べた。このことは、マメ科以外の植物も根粒菌との共生に必要な遺伝子のいくつかを保有している可能性が高いことを示している。マメ科以外の植物が、根粒菌との共生に必要な遺伝子をどの程度保有しているかを調べた研究によれば、欠落している遺伝子はごくわずかであることが明らかにされている。現在のところ、マメ科以外の植物に根粒菌との共生能力を獲得させることに成功した例は報告されていないが、マメ科以外の植物が根粒菌と共生して窒素固定するのは、荒唐無稽な夢物語ではないかも知れない。

マメ科植物に窒素肥料を施すと、根粒菌との共生は成立しない。植物にとっては、根粒菌と共生するよりも、肥料があれば、それを利用して成長する方が効率的なのである。さらに、肥料を与えて育てた植物の生育は、根粒菌との共生によってのみ育成した植物よりも優れている。生産現場では、マメ科作物を栽培する場合には、根粒菌との共生が阻害されない程度の窒素肥料が用いられている。そこで、併用する窒素肥料を削減するために、根粒菌あるいは植物を改変して、窒素固定能力を強化する研究が行われている。

ミヤコグサでは、国内の自生する地域によって、複数のエコタイプが知られている。そのうち、2種類のエコタイプの窒素固定活性が異なることに着目して、窒素固定能力の強化に取り組んでいるグループがある。彼らは、その原因を追求した結果、窒素固定活性の違いを決定している遺伝子は *SEN1* 遺伝子であることを見出した。片方の *SEN1* 遺伝子では、一つのアミノ酸を指定する領域が多く、その遺伝子を保有すると、窒素固定活性が高まる。また、同様な現象が、ダイズでも見られることを示した。今後、*SEN1* 遺伝子に注目することで、さらに窒素固定能力を強化した品種の開発が期待されることである。

最後に、報告した研究成果は、多くの方々の協力によって得られた成果であることを申し添えておく。