

酸性硫酸塩土壌におけるイネ科先駆植物内生窒素固定細菌の分子生態  
生命分子化学講座 根圏制御学分野  
蔭山 千寿

【背景および目的】 荒廃地に最初に侵入・定着するパイオニア植物は、リン酸を供給するアーバスキュラー菌根（AM）菌や窒素固定菌などの土壌微生物と共生することで必須養分を獲得し、ストレス環境に適応していることが示唆されている。近年、代表的なイネ科パイオニア植物であるススキにおいては、内生の窒素固定細菌がこの植物の窒素獲得に貢献している可能性が指摘されているものの、その生態はよくわかっていない。一方、生物的窒素固定反応には多量のリン酸が必要であり、窒素固定活性はしばしば環境中のリン酸量に律速されることが知られている。本研究では、強酸性を呈し植生回復が困難な問題土壌の一つである酸性硫酸塩土壌をモデルフィールドに、ススキ内生窒素固定細菌の生態や窒素固定活性に及ぼす土壌化学性およびリン酸の影響を明らかにするために、ニトロゲナーゼレダクターゼ遺伝子（*nifH*）の mRNA の塩基配列に基づく群集構造解析を行うと共に、AM 菌共生が *nifH* 遺伝子の発現および宿主の窒素獲得に及ぼす影響を調べた。

【材料と方法】 北海道蘭越町、愛知県幡豆町および沖縄県名護市に露頭した酸性硫酸塩土壌に自生するススキ 15 個体の根圏から土壌を採取し、温室内で約 2 か月間ススキ実生を栽培した。地下部を表面殺菌後、液体窒素存在下で全 RNA を抽出した。これを鋳型に cDNA を合成し、*nifH* mRNA の約 370 bp をユニバーサルプライマーを用いて nested PCR により増幅した。PCR 産物が得られたサンプル(6-7 サンプル/サイト)ごとにクローンライブラリーを作製し、それぞれからランダムに選んだクローン（蘭越, 98; 幡豆, 124; 名護, 153 クローン）の塩基配列を決定した。アミノ酸配列に基づく系統解析により分類単位を規定し、正準相関分析により各分類群の出現と相関のある環境因子の特定を行った。さらに、各分類群の *nifH* 遺伝子を特異的に増幅できる PCR プライマーを設計した。

蘭越町より採取したススキ根圏土壌と非根圏土壌を 1:1 の割合で混合して滅菌したものに、滅菌前の土壌のろ液を添加した。ここにススキを播種し、30 mL の 100  $\mu$ M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を週 1 回施用した区および AM 菌 *Glomus* sp. RF1 を接種した区を設けて約 7 週間栽培した。根から抽出した全 RNA を鋳型に cDNA を合成し、分類群特異的プライマーにより *nifH* mRNA の検出を行った。また、ススキ地上部の乾物重、リンおよび窒素吸収量を測定した。

【結果と考察】 酸性硫酸塩土壌に自生するススキ根内からは、 $\alpha$ -および $\beta$ -プロテオバクテリア、グラム陽性細菌などに属する 10 系統が検出され、その構成は土壌窒素や pH の影響を受けるものの、地理的・気候的要因の影響は小さいことを明らかにした。リン栄養の改善により、ススキのバイオマス量および窒素獲得量が増加した。特に AM 形成による窒素獲得量はリン酸施用によるものよりも有意に高く、*nifH* mRNA の検出頻度も他の区と比べて格段に上昇した。中でも特に高頻度に検出されたのは、メタン酸化菌である *Methylocapsa acidiphila* に近縁種の *nifH* mRNA であった。今後は、本研究において設計した分類群特異的プライマーを用いて定量的 RT-PCR を行う技術の確立が課題である。