

# 根粒菌超多着生機構を持続可能な農業へ応用

BIO23113236 寺谷優輝

2025年12月16日

## 第Ⅰ部

### 序論

#### 1 現代農業の課題

現代農業は、20世紀半ばの「緑の革命」以降、化学肥料の大量投入によって飛躍的な生産性向上を実現してきた。特に窒素肥料は作物の成長に不可欠であり、世界の食糧生産を支える基盤となっている。しかし、この化学肥料依存型の農業システムは、深刻な環境問題を引き起こしている。

窒素肥料の過剰施用は、地下水への硝酸態窒素の流出を招き、飲料水の汚染や富栄養化による生態系の破壊をもたらしている。また、窒素肥料の製造には膨大なエネルギーが必要であり、ハーバー・ボッシュ法によるアンモニア合成だけで世界のエネルギー消費の約1~2%を占めるとされる。さらに、農地から放出される亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) は二酸化炭素の約300倍の温室効果を持ち、地球温暖化の一因となっている。加えて、化学肥料の価格は国際情勢やエネルギー価格に左右されやすく、農家の経営を圧迫する要因ともなっている。

このような背景から、環境負荷が低く、エネルギー効率の高い窒素供給システムの構築が、持続可能な農業の実現に向けて急務となっている。

#### 2 なぜ根粒菌なのか

根粒菌は、マメ科植物の根に共生し、大気中の窒素ガスを植物が利用可能なアンモニアに変換する生物学的窒素固定を行う土壤細菌である。この自然のプロセスは、化学肥料に頼らずに作物に窒素を供給する持続可能な方法として、古くから注目してきた。

生物学的窒素固定は、ニトロゲナーゼという酵素複合体によって常温常圧下で進行する。これは、高温高圧を必要とするハーバー・ボッシュ法と対照的であり、エネルギー効率の観点から極めて優れている。また、根粒菌による窒素固定は必要な分だけ行われるため、過剰施肥による環境汚染のリスクも低い。

マメ科作物は、この共生関係により化学肥料をほとんど必要とせず栽培できるため、世界中で重

重要なタンパク源として利用されている。さらに、輪作体系にマメ科作物を組み込むことで、土壤への窒素供給と地力の維持が可能となる。近年では、根粒菌の窒素固定能力をイネやコムギなどの非マメ科作物にも応用できないかという研究が進められており、実現すれば農業に革命的な変化をもたらす可能性がある。

### 3 レポートの目的

根粒菌とマメ科植物の共生において、根に形成される根粒の数は窒素固定能力に直結する重要な要素である。通常の栽培条件下では、植物は根粒形成を一定数に制限する自己調節機構を持っているが、一部の変異体では「超多着生」と呼ばれる現象が観察される。これらの変異体は通常の数倍から数十倍もの根粒を形成し、その分子機構の解明は、窒素固定能力を最大化した作物開発への鍵となる。

本レポートでは、根粒の超多着生を制御する分子機構について、最新の研究知見をもとに詳細に考察する。特に、植物が持つ全身性の根粒形成調節システムであるオートレギュレーション機構に焦点を当て、関与する受容体キナーゼ、ペプチドリガンド、シグナル伝達経路の役割を明らかにする。さらに、この基礎的理解が、将来的にどのように持続可能な農業技術の開発に貢献しうるのか、その可能性と課題について検討する。

## 第 II 部

### 根粒菌と窒素固定の基礎

#### 4 窒素循環と植物栄養

窒素は、タンパク質や核酸などの生体高分子を構成する必須元素であり、すべての生物にとって欠かせない栄養素である。植物の成長において、窒素は光合成に関わる葉緑素の構成成分でもあり、不足すると葉の黄化や生育不良を引き起こす。このため、窒素は植物の三大栄養素（窒素、リン、カリウム）の中でも特に重要な位置を占めている。

地球の大気は約 78% が窒素ガス ( $N_2$ ) で占められており、窒素は地球上で最も豊富な元素の一つである。しかし、大気中の窒素ガスは二つの窒素原子が三重結合で強固に結びついているため、化学的に極めて安定である。この結合を切断するには非常に大きなエネルギーが必要であり、植物は直接  $N_2$  を利用することができない。植物が吸収できる窒素の形態は、アンモニウムイオン ( $NH_4^+$ ) または硝酸イオン ( $NO_3^-$ ) に限られている。

自然界では、窒素は複雑な循環系を形成している。大気中の窒素ガスは、雷による放電や一部の微生物による窒素固定によってアンモニアに変換される。このアンモニアは土壤中で硝化細菌によって硝酸に酸化され、植物に吸収される。植物体内に取り込まれた窒素は、有機窒素化合物として動物に受け継がれ、最終的に微生物による分解を経て再びアンモニアとなる。さらに、脱窒素細

菌の働きにより、硝酸は窒素ガスに還元されて大気に戻る。この一連の窒素循環において、生物学的窒素固定は大気中の窒素を生物圏に導入する最も重要な経路であり、年間約1億2000万トンもの窒素が固定されていると推定される。

\*\*図1：窒素循環の模式図\*\*

## 5 根粒菌とは

根粒菌は、主にマメ科植物の根に共生して窒素固定を行うグラム陰性の土壌細菌の総称である。根粒菌は、宿主植物の根に侵入し、根粒と呼ばれる特殊な器官を形成させる。この根粒内部で、根粒菌は植物から光合成産物（主に糖類）を受け取り、その代謝エネルギーを用いて大気中の窒素ガスをアンモニアに変換する。固定されたアンモニアは植物に供給され、植物の成長を支える。この相互依存的な関係は、眞の意味での相利共生の典型例として知られている。

根粒菌は分類学的に多様であり、主にアルファプロテオバクテリア綱に属する複数の属に分類される。代表的なものとして、ダイズと共生するブラジリゾビウム属 (*Bradyrhizobium japonicum*)、クローバーやエンドウと共生するリゾビウム属 (*Rhizobium leguminosarum*)、アルファルファと共に共生するシノリゾビウム属 (*Sinorhizobium meliloti*)、そしてモデル植物であるミヤコグサと共に共生するメソリゾビウム・ロティ (*Mesorhizobium loti*) などが挙げられる。近年では、ベータプロテオバクテリア綱に属する一部の細菌も根粒を形成することが発見されており、窒素固定共生の進化的多様性が明らかになってきている。

根粒菌と宿主植物の間には、高度な宿主特異性が存在する。各根粒菌種は特定のマメ科植物種または属としか共生関係を形成できず、この特異性は細菌が産生するシグナル分子 (Nod ファクター) の化学構造と、植物側の受容体の認識機構によって決定される。この精巧な分子レベルの対話が、効率的な共生関係の確立を可能にしている。

\*\*図2：根粒の構造（縦断面図）\*\*

根粒の内部構造は高度に分化しており、外側から内側に向かって、皮層、維管束組織、感染領域、そして先端の分裂組織から構成される。感染領域では、根粒菌は「バクテロイド」と呼ばれる特殊な分化形態に変化し、活発に窒素固定を行う。バクテロイドは通常の根粒菌細胞と比べて肥大化し、ニトロゲナーゼ酵素を高発現している。また、植物細胞は「ペリバクテロイド膜」と呼ばれる特殊な膜でバクテロイドを包み込み、細胞内共生器官様の構造を形成する。この膜を介して、植物は糖を供給し、固定された窒素を受け取る精密な物質交換が行われる。

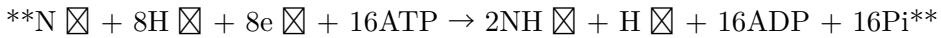
## 6 窒素固定のメカニズム

生物学的窒素固定は、ニトロゲナーゼという酵素複合体によって触媒される。この反応は、自然界で最も重要な生化学反応の一つであり、化学的に極めて安定な窒素分子の三重結合を切断して、アンモニアを生成する。

ニトロゲナーゼは二つのタンパク質成分から構成される。一つは鉄タンパク質 (Fe タンパク質)

で、もう一つはモリブデン-鉄タンパク質 (MoFe タンパク質) である。Fe タンパク質は電子供与体として機能し、ATP の加水分解エネルギーを利用して MoFe タンパク質に電子を渡す。MoFe タンパク質は、その活性中心である FeMo 補因子 (鉄-モリブデン-硫黄クラスター) において、実際に窒素分子を結合させ、段階的に還元する。

窒素固定の全反応式は以下のように表される：



この反応から分かるように、窒素分子一つをアンモニア二分子に変換するには、8 個の電子と 16 分子の ATP が必要である。さらに、この反応では必然的に水素ガスが副産物として生成される。このエネルギー要求量の高さは、窒素分子の三重結合がいかに安定であるかを物語っている。

ニトロゲナーゼ酵素には重要な特性がある。それは、酸素に対して極めて脆弱であるという点である。酸素分子に曝露されると、ニトロゲナーゼは不可逆的に失活してしまう。しかし、窒素固定には大量の ATP が必要であり、そのためには好気呼吸によるエネルギー生産が不可欠である。この矛盾を解決するため、根粒内では精巧な酸素制御機構が働いている。

根粒では、レグヘモグロビンと呼ばれる酸素結合タンパク質が高濃度で発現している。レグヘモグロビンは動物のヘモグロビンと類似した構造を持ち、酸素に対して高い親和性を示す。このタンパク質が根粒内の遊離酸素濃度を極めて低いレベルに保ちながら、必要な酸素をバクテロイドの呼吸鎖に供給する。成熟した窒素固定根粒の内部が特徴的なピンク色を呈するのは、このレグヘモグロビンの存在による。この巧妙な酸素制御システムにより、根粒内では好気呼吸と窒素固定という相反する要求が両立されている。

**\*\*図 3：窒素固定反応の模式図\*\***

窒素固定反応の効率は、環境条件に大きく影響される。特に、土壤中の硝酸態窒素濃度が高い場合、植物は根粒形成を抑制し、既存の根粒における窒素固定活性も低下させる。これは、エネルギーコストの高い窒素固定よりも、土壤から直接窒素を吸収する方が効率的であるためである。この調節機構は、植物が環境中の窒素利用可能性に応じて、最適な窒素獲得戦略を選択していることを示している。

## 第 III 部

### 根粒形成のメカニズム

#### 7 感染プロセスの段階

根粒形成は、根粒菌と宿主植物の間で交わされる精巧な分子対話によって進行する、高度に制御されたプロセスである。このプロセスは複数の段階を経て進行し、各段階で特異的な遺伝子発現と形態変化が誘導される。

**\*\*1. 認識段階 (Nod ファクターシグナリング) \*\***

共生の開始は、植物の根から分泌されるフラボノイド化合物を根粒菌が感知することから始ま

る。マメ科植物の根は、ルテオリンやゲニステインなどのフラボノイドを根圏に放出しており、これらの化合物は土壤中の根粒菌に対する化学誘引物質として機能する。根粒菌は、細胞膜に存在する NodD タンパク質を介してこれらのフラボノイドを認識すると、nod 遺伝子群の発現を活性化する。

活性化された nod 遺伝子群は、Nod ファクターと呼ばれる特殊なシグナル分子を合成する。Nod ファクターは、リポキトオリゴ糖 (LCO) と呼ばれる化学構造を持ち、3~5 個の N-アセチルグルコサミンが連なった骨格に、長鎖脂肪酸が結合した構造をとる。この Nod ファクターの化学構造、特に修飾基のパターンは根粒菌種によって異なり、宿主特異性を決定する鍵となる。植物側は、根毛の細胞膜上に存在する受容体様キナーゼ (NFR1/NFR5 や NFP/LYK3 など) によって Nod ファクターを認識し、共生シグナル伝達経路を活性化する。

#### \*\*2. 根毛の湾曲\*\*

Nod ファクターシグナルを受容した根毛細胞では、劇的な形態変化が起こる。通常まっすぐに伸長する根毛が、根粒菌の付着部位において内側に湾曲し始める。この湾曲は、細胞内のカルシウムイオン濃度の振動 (カルシウムスパイキング) によって制御されている。核周辺部において数分間隔で繰り返されるカルシウム濃度の上昇は、CCaMK と呼ばれるカルシウム・カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼを活性化し、下流の転写因子を介して共生関連遺伝子の発現を誘導する。

根毛の湾曲により、根粒菌は根毛表面の小さなポケット状の空間、いわゆる「感染ポケット」に捕捉される。この空間では根粒菌の局所的な増殖が起こり、次の段階である感染糸形成の起点となる。根毛の湾曲は接種後数時間以内に観察され、共生の初期応答として重要な役割を果たす。

#### \*\*3. 感染糸の形成\*\*

感染ポケットに捕捉された根粒菌は、植物細胞壁を局所的に分解しながら、細胞内への侵入を開始する。しかし、根粒菌は細胞質に直接侵入するのではなく、「感染糸」と呼ばれる植物由来の管状構造の内部を通って進入する。感染糸は、植物の細胞膜が陷入して形成される管であり、その内壁は細胞壁成分で覆われている。

感染糸の伸長は、根毛の先端成長と類似したメカニズムで進行する。細胞骨格の再編成により、ゴルジ体由来の小胞が感染糸の先端部に集積し、膜と細胞壁成分を供給する。根粒菌は感染糸内で増殖しながら、根毛細胞の基部に向かって進んでいく。感染糸の伸長速度は、根粒菌の増殖速度と同調しており、精密な制御が行われていることを示している。

感染糸が根毛の基部に到達すると、さらに外層の皮層細胞へと進入していく。この過程では、感染糸が細胞間を渡る際に細胞壁を通過する必要があり、植物は局所的に細胞壁を軟化させて通路を形成する。感染糸の進行経路は予め決定されており、最終的に根粒原基と呼ばれる分裂中の細胞群へと誘導される。

#### \*\*4. 根粒原基の形成\*\*

感染プロセスと並行して、根の皮層細胞では細胞分裂が誘導される。通常、成熟した皮層細胞は分裂能力を失っているが、Nod ファクターシグナルと感染糸からのシグナルにより、これらの細胞は再び細胞周期に入る。特に内側皮層や外側皮層の特定の細胞層が脱分化して活発に分裂し、根粒原基と呼ばれる細胞塊を形成する。

根粒原基の形成位置は、根の種類によって異なる。多くのマメ科植物では内側皮層由来の根粒(内生根粒)を形成するが、ダイズやササゲなどでは外側皮層由来の根粒(外生根粒)を形成する。また、根粒の形態にも多様性があり、ミヤコグサやダイズでは球形の「決定型根粒」が、エンドウやクローバーでは円筒形で持続的に成長する「不定型根粒」が形成される。

根粒原基の細胞は、感染糸が到達するまで分裂を続け、数層からなる組織を形成する。感染糸が根粒原基内の細胞に到達すると、根粒菌はエンドサイトーシス様の機構で個々の細胞内に取り込まれる。この際、根粒菌は植物細胞膜由来のペリバクテロイド膜に包まれた状態で細胞質に放出される。

#### \*\*5. 根粒の成熟\*\*

細胞内に放出された根粒菌は、バクテロイドへと分化する。バクテロイドは、自由生活型の根粒菌細胞とは形態的にも生理的にも大きく異なる。多くの場合、バクテロイドは細胞が肥大化して多倍体となり、自己増殖能力を失う。この分化過程は、植物が産生するNCRペプチドなどのシグナル分子によって制御されている。

バクテロイドへの分化と並行して、根粒組織全体の分化が進行する。根粒内部には維管束組織が発達し、宿主植物の維管束系と連結する。これにより、植物から根粒への糖の供給と、根粒で固定された窒素化合物の植物体への輸送経路が確立される。また、感染領域では前述のレグヘモグロビンが高発現し、根粒全体が特徴的なピンク色を呈するようになる。

成熟した根粒では、ニトロゲナーゼ遺伝子群(nif遺伝子)が高発現し、活発な窒素固定が開始される。根粒の外層には酸素バリアとして機能する細胞層が形成され、内部の微好気環境を維持する。この段階で根粒は完全に機能的な窒素固定器官となり、宿主植物に窒素を供給し始める。根粒の寿命は植物種や環境条件によって異なるが、決定型根粒では数週間から数ヶ月、不定型根粒ではより長期間にわたって機能を維持する。

#### \*\*図4：感染プロセスの段階的図解\*\*

## 8 分子メカニズム

根粒形成を制御する分子機構は、過去30年間の研究により詳細に解明してきた。特に、Nodファクターを起点とするシグナル伝達経路の解明は、植物-微生物相互作用研究の金字塔といえる成果である。

#### \*\*Nodファクター（リポキトオリゴ糖）の構造と機能\*\*

Nodファクターは、キチンオリゴ糖骨格を基本構造とする脂質化合物である。基本骨格は3~5個の $\beta$ -1,4結合したN-アセチルグルコサミン残基からなり、非還元末端の窒素原子には炭素数16~18の不飽和脂肪酸が結合している。この基本構造に加えて、還元末端や非還元末端には様々な修飾基が付加される。

これらの修飾には、O-アセチル基、O-カルバモイル基、硫酸基、メチル基、フコース残基などが含まれ、その組み合わせは根粒菌種によって特異的である。例えば、*S. meliloti*のNodファクターはC16:2の不飽和脂肪酸と還元末端の硫酸基を持つのに対し、*M. loti*のNodファクターは

C16:0 の飽和脂肪酸とアセチル基修飾を特徴とする。この化学的多様性が、宿主-根粒菌間の特異性認識の分子基盤となっている。

興味深いことに、Nod ファクターの構造は病原性真菌の細胞壁成分であるキチンオリゴ糖と類似している。植物は通常、キチンオリゴ糖を病原体関連分子パターン (PAMP) として認識し、防御応答を活性化する。しかし、Nod ファクターの脂肪酸修飾と特異的な修飾基パターンにより、植物の受容体システムは共生菌と病原菌を識別し、適切な応答を選択することができる。

#### \*\*受容体タンパク質と認識機構\*\*

Nod ファクターの認識は、植物の根毛細胞膜上に局在する受容体様キナーゼ (RLK) によって行われる。ミヤコグサでは、NFR1(Nod Factor Receptor 1) と NFR5 という二つの受容体が協調して Nod ファクターを認識する。NFR1 はキナゼドメインを持つ LysM 型受容体であり、NFR5 はキナゼドメインを欠く受容体様タンパク質である。

LysM ドメインは、本来細菌のペプチドグリカンやキチンなどの糖鎖を認識する構造モジュールであり、植物の自然免疫において重要な役割を果たす。NFR1 と NFR5 は、それぞれ細胞外領域に 3 個の LysM ドメインを持ち、Nod ファクターのオリゴ糖骨格と脂肪酸鎖を協調的に認識すると考えられている。構造生物学的研究により、LysM ドメインが Nod ファクターの糖鎖部分を結合する様子が明らかにされており、受容体の種特異性と Nod ファクター構造の対応関係が分子レベルで理解されつつある。

Nod ファクターが受容体に結合すると、受容体複合体の形成と活性化が起こる。NFR1 のキナゼドメインが自己リン酸化され、さらに下流のシグナル伝達因子をリン酸化することで、細胞内へのシグナルが伝達される。近年の研究では、受容体の活性化には膜マイクロドメイン (脂質ラフト) への局在が重要であることも示されている。

#### \*\*シグナル伝達経路の全体像\*\*

Nod ファクター受容体の活性化は、複雑なシグナル伝達カスケードを引き起こす。このシグナル伝達経路は「共通共生経路 (Common Symbiosis Pathway)」と呼ばれ、根粒共生だけでなく、アーバスキュラー菌根 (AM 菌根) 共生にも共通して用いられる進化的に保存された経路である。

受容体の下流では、まず SYMRK と呼ばれる受容体様キナーゼが活性化される。SYMRK は、細胞内のシグナル伝達複合体の足場として機能し、複数のタンパク質を集合させる。次に、核膜上に局在するカリウムイオンチャネルタンパク質 (CASTOR, POLLUX/DMI1) が活性化される。これらのイオンチャネルの開口により、核周辺部でのカルシウムイオン濃度の振動、すなわちカルシウムスパイキングが誘導される。

カルシウムスパイキングは、数分間隔で数十回繰り返される特徴的なパターンを示し、このパターンがシグナルの特異性を規定していると考えられている。核に局在する CCaMK(Calcium and Calmodulin-dependent protein Kinase) は、このカルシウム振動を感じて活性化される。CCaMK は、カルシウム結合ドメインとカルモジュリン結合ドメインを持ち、カルシウムシグナルを直接解読できる分子スイッチとして機能する。

活性化された CCaMK は、CYCLOPS(または IPD3) と呼ばれる転写因子をリン酸化する。CYCLOPS は核内に移行し、NSP1, NSP2 などの他の転写因子と複合体を形成して、感染と根粒

形成に必要な数百の遺伝子の発現を協調的に制御する。これらの標的遺伝子には、細胞周期関連遺伝子、細胞壁修飾酵素、感染糸形成に関わる遺伝子、そして根粒特異的な転写因子などが含まれる。

興味深いことに、この共通共生経路の構成因子の多くは、遺伝学的解析により単離された共生不全変異体の原因遺伝子として同定された。これらの変異体の解析により、各シグナル伝達因子の機能と、経路全体の構造が明らかにされてきた。

\*\*図 5：Nod ファクターシグナル伝達の模式図\*\*

## 9 遺伝子レベルの制御

根粒共生は、根粒菌と植物の双方において、特異的な遺伝子セットの協調的発現によって実現される。これらの遺伝子は機能別にいくつかのカテゴリーに分類され、それぞれが共生確立の異なる側面を担っている。

\*\*nod 遺伝子群（根粒菌側）\*\*

根粒菌のゲノムには、共生に必要な遺伝子群が特定の領域に集中している。この領域は「共生アイランド」または「共生プラスミド」と呼ばれ、水平伝播によって獲得された可能性が指摘されている。

nod 遺伝子群は、Nod ファクターの生合成と分泌に関わる。主要な nod 遺伝子とその機能は以下の通りである：

- \*\*nodD\*\*: フラボノイド感知転写制御因子。宿主植物からのシグナルを感じし、他の nod 遺伝子の転写を活性化する。
- \*\*nodA, nodB, nodC\*\*: Nod ファクターの基本骨格（キチンオリゴ糖）合成の中心的酵素群。NodC はキチンオリゴ糖合成酵素、NodB は脱アセチル化酵素、NodA はアシル基転移酵素として機能する。
- \*\*nodE, nodF\*\*: 脂肪酸鎖の合成と修飾に関与。不飽和度や炭素鎖長を決定する。
- \*\*nodH, nodL, nodS, nodQ\*\*: 糖鎖への修飾基付加に関与。硫酸化、アセチル化、カルバモイル化などの修飾を触媒する。

これらの遺伝子の発現パターンと産物の活性により、各根粒菌種特異的な Nod ファクター構造が決定される。興味深いことに、異なる根粒菌種間で nod 遺伝子を交換する実験により、宿主特異性を人為的に改変できることが示されている。

\*\*nif 遺伝子群と fix 遺伝子群（根粒菌側）\*\*

窒素固定に直接関与する遺伝子群は、nif(nitrogen fixation) 遺伝子と fix(fixation) 遺伝子に分類される。これらの遺伝子は、根粒環境という特殊な条件下でのみ発現する。

主要な nif/fix 遺伝子とその機能：

- \*\*nifH, nifD, nifK\*\*: ニトロゲナーゼ酵素の構造遺伝子。NifH は鉄タンパク質、NifD と NifK はモリブデン-鉄タンパク質のサブユニットをコードする。
- \*\*nifE, nifN, nifB\*\*: FeMo 補因子の生合成に関与。
- \*\*fixA, fixB, fixC, fixX\*\*: 電子伝達系の構成因子。ニトロゲナーゼへの電子供給経路を形成する。
- \*\*fixN, fixO, fixP, fixQ\*\*: 高親和性シトクロム c オキシダーゼをコードし、微好気条件下での呼吸を可能にする。

これらの遺伝子の発現は、酸素濃度の低下と植物由来のシグナルによって誘導される。転写制御

因子 NifA と FixLJ 二成分制御系が中心的な役割を果たし、根粒環境を感じて適切な遺伝子発現プログラムを活性化する。

#### \*\*宿主植物側の共生関連遺伝子\*\*

植物側でも、根粒共生に特異的な遺伝子群が発現誘導される。これらは数百から数千の遺伝子に及び、トランスクリプトーム解析により包括的に同定されている。

#### 主要な植物側遺伝子カテゴリー：

- \*\*受容体とシグナル伝達因子\*\*: 前述の NFR1/5, SYMRK, CCaMK, CYCLOPS など。共生シグナルの認識と伝達を担う。
- \*\*転写制御因子\*\*: NSP1, NSP2, ERN1(ERF Required for Nodulation), NIN(Nodule Inception) など。これらは転写カスケードを形成し、下流遺伝子の発現を制御する。特に NIN は根粒形成のマスターレギュレーターとして機能する。

- \*\*感染プロセス関連遺伝子\*\*: 感染糸形成に必要な細胞骨格制御因子、小胞輸送因子、細胞壁修飾酵素など。RPG や VPY, SYMREM などが同定されている。

- \*\*根粒発生・分化遺伝子\*\*: 細胞周期再開に関わるサイクリン遺伝子、根粒特異的転写因子、器官発生制御因子など。

- \*\*根粒機能維持遺伝子\*\*: レグヘモグロビン遺伝子 (LB), 栄養輸送体 (糖輸送体、アミノ酸輸送体), NCR ペプチド遺伝子 (ダイズ型根粒では発現しない) など。レグヘモグロビンは根粒特異的に高発現し、酸素制御に不可欠である。

これらの遺伝子の多くは、根粒組織特異的なプロモーターによって制御されており、時空間的に精密な発現パターンを示す。例えば、レグヘモグロビン遺伝子は感染領域でのみ高発現し、根粒の機能的分化を反映している。また、一部の遺伝子は根粒形成の特定の段階でのみ発現するなど、発生プログラムに組み込まれている。

近年のゲノムワイドな解析により、根粒共生に関わる遺伝子の多くが、植物の進化過程で既存の遺伝子が重複・改変されて生じたことが明らかになっている。特に、受容体キナーゼや転写因子などのシグナル伝達因子は、病原体応答や発生制御に関わる遺伝子から進化したと考えられている。この事実は、根粒共生が比較的最近（約 6000 万年前）に進化した形質であることと整合的である。

## 第 IV 部

# 超多着生機構の解明

## 10 通常の着生制御

根粒共生は植物にとって窒素供給の重要な手段であるが、根粒形成と維持には多大なコストがかかる。植物は光合成産物の最大 20% を根粒に供給する必要があり、さらに根粒形成自体にも発生プログラムの活性化という代謝的負担が伴う。このため、植物は根粒の数を適切に制御し、窒素需要とエネルギーコストのバランスを最適化する必要がある。

この制御機構は「オートレギュレーション (Autoregulation of Nodulation: AON)」と呼ばれ、1980 年代の生理学的研究により発見された。AON の存在は、分割根実験によって明確に実証された。この実験では、一つの植物体の根系を二つに分け、片方の根にのみ根粒菌を接種する。すると、接種した側の根では根粒が形成されるが、接種していない側の根に後から根粒菌を接種しても、根粒形成が強く抑制されることが観察された。この現象は、先に形成された根粒から全身性のシグナルが発せられ、植物体全体の根粒形成能力を抑制していることを示している。

AON による制御は段階的に機能する。根粒菌の感染が開始されると、感染部位の根から地上部へと「根由来シグナル」が送られる。このシグナルは維管束を通じて茎頂部まで輸送され、そこで受容・処理される。茎頂部では、受容したシグナルに応じて「地上部由来抑制シグナル」が產生され、再び維管束を通じて根系全体に送られる。この抑制シグナルを受け取った根では、新たな根粒形成が抑制されるだけでなく、既存の感染糸の伸長も停止する。

なぜ根粒数が制限される必要があるのか。その理由は複数考えられる。第一に、エネルギー収支の最適化である。根粒は光合成産物を大量に消費するため、過剰な根粒形成は植物の成長を阻害する。第二に、土壤中の窒素濃度に応じた調節である。十分な窒素が土壤から得られる場合、エネルギーコストの高い窒素固定は不経済となる。実際、硝酸態窒素の存在下では根粒形成が強く抑制される(窒素抑制)。第三に、根粒の質的制御である。すべての根粒が効率的に窒素固定を行うわけではなく、一部には固定能力の低い「無効根粒」も形成される。植物は限られたリソースを効率的な根粒に集中させるため、総数を制限していると考えられる。

AON は根粒形成の初期段階から機能する。Nod ファクター処理後、数時間以内に根からのシグナル発信が始まり、24~48 時間後には地上部からの抑制シグナルが根に到達する。この迅速な応答により、植物は感染初期の段階で根粒数を調節できる。興味深いことに、AON は根粒原基の数だけでなく、個々の根粒のサイズにも影響を与える。強い AON 条件下では、少数の小型根粒が形成される傾向がある。

\*\*図 6：オートレギュレーション機構の概略\*\*

## 11 超多着生の発見

AON 機構の分子実体は、1990 年代から 2000 年代にかけて、遺伝学的アプローチによって明らかにされた。研究者たちは、通常の数倍から数十倍もの根粒を形成する「ハイパーノジュレーション(超多着生)変異体」を単離し、その原因遺伝子を同定することで、AON 経路の構成因子を次々と明らかにしていった。

\*\*主要な超多着生変異体の発見\*\*

最初の超多着生変異体は、1989 年にダイズで報告された nts(nitrate-tolerant symbiotic) 変異体である。通常、ダイズは硝酸態窒素の存在下で根粒形成が抑制されるが、nts 変異体はこの窒素抑制に対して耐性を示し、さらに通常の 3~5 倍の根粒を形成した。この発見は、窒素による根粒形成制御と、根粒数の全身性制御が共通のメカニズムを持つ可能性を示唆した。

その後、複数のマメ科植物種で超多着生変異体が単離された。ミヤコグサでは har1(hypernodu-

lation aberrant root formation 1) 変異体が、エンドウでは sym29 変異体が、アルファルファでは sunn(super numeric nodules) 変異体が報告された。これらの変異体は、いずれも根粒数が劇的に増加するという共通の表現型を示した。

#### \*\*変異体の表現型的特徴\*\*

超多着生変異体の最も顕著な特徴は、根系全体に密集して形成される無数の根粒である。通常、野生型のミヤコグサは一個体あたり 10~20 個程度の根粒を形成するが、har1 変異体では 100 個以上の根粒が観察される。これらの根粒は主根だけでなく、側根にも多数形成され、時には根粒同士が融合したような異常形態も見られる。

興味深いことに、超多着生変異体では根粒数は増加するものの、個々の根粒は小型化する傾向がある。また、植物体全体の窒素含量を測定すると、根粒数の増加に比例して窒素固定能力が向上するわけではない。これは、過剰な根粒形成が植物の光合成能力を超えてしまい、個々の根粒への糖供給が不足するためと考えられる。実際、多くの超多着生変異体では、植物体の生育が野生型よりも劣る。これは、根粒形成に過剰なエネルギーが消費され、植物の成長に回せるリソースが不足するためである。

さらに、超多着生変異体の中には、根の発生パターンにも異常を示すものがある。例えば、har1 変異体では側根の数が減少し、根系全体のアーキテクチャーが変化する。この観察は、AON 経路が根粒形成だけでなく、根の発生全般にも関与していることを示唆している。

#### \*\*遺伝学的解析による遺伝子同定\*\*

これらの超多着生変異体の原因遺伝子は、ポジショナルクローニング法や候補遺伝子アプローチによって同定された。驚くべきことに、異なる植物種で単離された変異体の多くが、相同な遺伝子の変異によるものであることが判明した。

- \*\*HAR1/SUNN/NARK\*\*: ダイズの nts と nar1k, エンドウの sym29, ミヤコグサの har1, アルファルファの sunn は、いずれもロイシンリッチリピート (LRR) 型受容体キナーゼをコードする遺伝子の変異であった。この受容体キナーゼは、シロイヌナズナの CLAVATA1(CLV1) と高い相同性を持ち、茎頂分裂組織のサイズ制御に関わる CLV1 と同様に、茎頂部で高発現する。

- \*\*KLAVIER/PLENTY\*\*: ミヤコグサの klavier(klv) 変異体とダイズの plenty 変異体は、LRR 型受容体様タンパク質 (受容体キナーゼに似ているがキナーゼドメインを欠く) をコードする遺伝子の変異であった。KLV は HAR1 と複合体を形成し、協調的に機能すると考えられている。

これらの遺伝子が受容体キナーゼをコードすることから、根由来のリガンド分子が存在し、それが茎頂部の受容体によって認識されることで、AON が機能するという仮説が支持された。

#### \*\*図 7：通常型と超多着生型の比較\*\*

## 12 超多着生の分子機構

超多着生変異体の原因遺伝子同定により、AON の分子機構が次第に明らかになってきた。現在では、根から地上部へのシグナル分子の同定と、その受容・伝達機構の理解が大きく進展している。

#### \*\*CLE ペプチド：根から地上部へのシグナル分子\*\*

AONにおける根由来シグナルの実体は、2008年から2009年にかけて、複数の研究グループによって同時期に明らかにされた。それは、CLE(CLAVATA3/Embryo Surrounding Region-related)ファミリーに属する小型ペプチドであった。

CLEペプチドは、約12~13アミノ酸からなる成熟ペプチドで、前駆体タンパク質のC末端領域がプロセシングされて生成される。シロイヌナズナでは、CLV3ペプチドが茎頂分裂組織において細胞分化を促進するシグナルとして機能し、CLV1受容体キナーゼによって認識される。マメ科植物では、複数のCLE遺伝子が根粒菌感染に応答して発現誘導されることが見出され、これらはRhizobia-induced CLE(RIC)と命名された。

ミヤコグサでは、LjCLE-RS1とLjCLE-RS2という二つのCLE遺伝子が根粒形成時に根で特異的に発現する。これらの遺伝子産物は、根粒菌の感染開始後、数時間以内に発現が上昇し、木部を通じて地上部へと輸送される。合成CLEペプチドを根に処理する実験により、これらのペプチドが実際に根粒形成を抑制する活性を持つことが確認された。さらに、CLE遺伝子の過剰発現株では根粒数が減少し、逆にRNA干渉によってCLE遺伝子の発現を抑制すると、根粒数が増加することが示された。

ダイズでは、GmRIC1とGmRIC2が同定され、これらのペプチドがNARK受容体に結合することが生化学的に実証された。興味深いことに、CLEペプチドの配列は植物種間で高度に保存されており、ミヤコグサのCLEペプチドがダイズの根粒形成を抑制できるなど、種を超えた機能的互換性が認められる。

#### \*\*HAR1/SUNN受容体キナーゼ: 地上部におけるシグナル受容\*\*

HAR1(およびその相同遺伝子SUNN, NARK)は、細胞外にロイシンリッチリピート(LRR)ドメイン、膜貫通領域、細胞内にキナーゼドメインを持つ典型的な受容体キナーゼである。この受容体は主に茎頂部の維管束周辺細胞で発現しており、根から輸送してきたCLEペプチドを認識する位置に局在している。

HAR1の細胞外LRRドメインは、CLEペプチドと直接結合することが示されている。この結合により、受容体の二量体化または多量体化が誘導され、細胞内キナーゼドメインの自己リン酸化と活性化が起こる。活性化されたHAR1は、下流のシグナル伝達因子をリン酸化し、地上部由來の抑制シグナルの产生を誘導する。

HAR1と協調して機能するKLAVIER(KLV)は、受容体キナーゼ様タンパク質であり、細胞外LRRドメインを持つがキナーゼドメインを欠いている。KLVはHAR1と物理的に相互作用し、共受容体として機能すると考えられている。klv変異体もhar1変異体と同様に超多着生表現型を示すが、その程度はやや軽度である。このことから、HAR1-KLV複合体による協調的なシグナル認識機構が提案されている。

最近の研究では、HAR1/SUNNの活性化には、ペプチドの翻訳後修飾が重要であることも明らかになっている。CLEペプチドの特定のプロリン残基はヒドロキシル化やアラビノシル化などの糖修飾を受け、この修飾が受容体との結合親和性を高める。このような複雑な修飾機構は、シグナルの特異性と調節可能性を高めていると考えられる。

#### \*\*全身性シグナル伝達: 根-地上部-根の対話\*\*

AON の全体像は、以下のような段階的プロセスとして理解されている。

1. \*\*感染シグナルの発生\*\*: 根粒菌の感染が開始されると、感染部位の根細胞で CLE 遺伝子の発現が誘導される。この誘導には、Nod ファクターシグナル伝達経路と、感染糸形成に伴う細胞内シグナルが関与する。
2. \*\*シグナルの長距離輸送\*\*: 產生された CLE ペプチドは、アポプラストを経由して木部に分泌され、蒸散流に乗って地上部へと輸送される。この輸送は比較的速く、数時間以内に地上部に到達する。
3. \*\*地上部でのシグナル受容と処理\*\*: 茎頂部に到達した CLE ペプチドは、維管束周辺細胞に発現する HAR1/SUNN 受容体に結合する。受容体の活性化により、細胞内でのシグナル伝達カスケードが始動する。
4. \*\*抑制シグナルの産生と下降輸送\*\*: HAR1 の下流では、転写因子や代謝経路が活性化され、地上部由来の抑制シグナル分子が产生される。この抑制シグナルの分子実体は長年不明であったが、近年、サイトカイニンやストリゴラクトンなどの植物ホルモン、あるいは未同定のペプチドが候補として提案されている。抑制シグナルは師部を通じて根へと輸送される。
5. \*\*根における応答\*\*: 根に到達した抑制シグナルは、根粒形成に関わる遺伝子発現を抑制し、新たな感染応答や根粒原基形成を阻害する。具体的には、NIN 転写因子の発現低下、感染糸伸長の停止、根粒原基形成の抑制などが起こる。

この一連のプロセスにより、植物は根系全体の根粒形成状況を統合的に監視し、適切な根粒数を維持することができる。このシステムは、個々の根が独立に応答するローカルな制御と、植物全体での協調的制御を組み合わせた、高度な生理学的調節機構といえる。

\*\*図 8：全身性 AON 制御の分子メカニズム\*\*

## 13 最新の研究動向

超多着生機構の基本的枠組みが明らかになった現在、研究の焦点はより精緻な制御機構の理解と、応用可能性の探索へと移ってきてている。

\*\*エピジェネティック制御\*\*

近年、根粒形成の制御にエピジェネティックな機構が関与することが明らかになってきた。DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリングなどのエピジェネティック機構は、遺伝子発現の長期的な記憶や環境応答に重要な役割を果たす。

ミヤコグサを用いた研究では、根粒形成関連遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾パターンが、根粒菌感染に応答して変化することが示された。特に、NIN 遺伝子のような重要な転写因子では、活性化型ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K9ac など) の蓄積が感染初期に観察される。逆に、AON によって根粒形成が抑制される条件下では、抑制型修飾 (H3K27me3 など) が増加する。

さらに、ヒストン修飾酵素をコードする遺伝子の変異体解析から、エピジェネティック機構が AON の制御にも関与することが示唆されている。例えば、ヒストン脱アセチル化酵素の変異体では、根粒数の増加が観察される例がある。これは、HAR1 シグナル伝達の下流で、クロマチンレベ

ルでの遺伝子発現制御が行われている可能性を示唆する。

また、小分子 RNA(マイクロ RNA, siRNA)による転写後制御も注目されている。特定のマイクロ RNA が根粒形成関連遺伝子の mRNA を標的とし、その翻訳を抑制することで、根粒数を調節する例が報告されている。これらのエピジェネティック機構は、環境変動に対する応答の記憶や、発生段階に応じた制御の微調整に寄与していると考えられる。

#### \*\*環境応答との統合的理 解\*\*

根粒形成は、窒素栄養状態だけでなく、リン酸、カリウム、硫黄などの他の栄養素、さらには光、温度、水分などの環境要因によっても影響を受ける。最近の研究により、AON 経路がこれらの環境シグナルと統合的に作用することが明らかになってきた。

特に重要なのが、窒素栄養との関係である。土壤中に硝酸態窒素が豊富に存在する場合、根粒形成は強く抑制される(窒素抑制)。この窒素抑制には、AON 経路とは独立した局所的な制御機構が関与するが、同時に HAR1/SUNN 経路を介した全身性の制御も働く。高窒素条件下では、CLE 遺伝子の発現が亢進し、AON による抑制が強化される。この二重の制御機構により、植物は窒素が十分な環境では、エネルギーコストの高い窒素固定を効率的に抑制できる。

リン酸欠乏条件下では、逆に根粒形成が促進される傾向がある。これは、リン酸ストレス応答に関わるホルモンシグナル(ストリゴラクトンなど)が、根粒形成を促進する方向に作用するためと考えられる。このような栄養素間の相互作用は、植物が複数の栄養制限を統合的に感知し、最適な資源配分戦略を選択していることを示している。

環境ストレスも根粒形成に影響する。乾燥、高温、塩ストレスなどは、一般に根粒形成と窒素固定活性を低下させる。これらのストレス条件下では、アブシシン酸(ABA)などのストレスホルモンが蓄積し、根粒形成関連遺伝子の発現を抑制する。興味深いことに、一部のストレス条件では、AON 経路の感受性が変化し、通常とは異なる根粒形成パターンが観察されることもある。

#### \*\*他の共生系への応用可能性\*\*

AON 機構の理解は、根粒共生だけでなく、他の植物-微生物相互作用の理解にも貢献している。特に注目されているのが、アーバスキュラー菌根(AM) 共生との関係である。

AM 菌根は、約 80% の陸上植物が形成する、より古い起源を持つ共生系である。AM 菌根形成においても、植物体内での菌根数を制御する全身性の調節機構が存在することが知られている。興味深いことに、根粒共生で機能する共通共生経路(NSP1, NSP2, CCaMK など)の多くの因子が、AM 菌根形成にも必須である。さらに最近の研究では、CLE-HAR1/SUNN 経路が AM 菌根形成の制御にも関与することが示唆されている。

ミヤコグサの har1 変異体では、根粒だけでなく AM 菌根の形成も増加する。また、特定の CLE ペプチドが、AM 菌根形成を抑制する活性を持つことも報告されている。これらの発見は、植物が進化的に古い AM 菌根形成の制御機構を流用して、比較的新しい根粒共生の制御系を構築した可能性を示唆している。

将来的には、AON 機構の人為的制御により、根粒と AM 菌根の両方を最適化した作物を開発できる可能性がある。例えば、HAR1 の発現レベルや活性を調節することで、環境条件に応じて共生の程度を変化させる「スマート作物」の創出が期待される。

### \*\*農業応用への展望\*\*

超多着生機構の理解は、持続可能な農業への応用という観点からも重要である。現状では、超多着生変異体は過剰な根粒形成により植物の生育が抑制されるため、直接的な農業利用は困難である。しかし、AON 経路の精密な制御により、窒素固定能力を最適化した作物の開発が期待される。

一つのアプローチは、HAR1/SUNN や CLE 遺伝子の発現を調節することである。例えば、環境応答性プロモーターを用いて HAR1 の発現を制御し、窒素欠乏時にのみ HAR1 の発現を低下させることで、必要な時に根粒数を増加させることができるかもしれない。あるいは、CLE 遺伝子の発現を部分的に抑制することで、野生型よりもやや多い根粒を形成させ、窒素固定能力を向上させることも考えられる。

もう一つの方向性は、AON 経路を利用した非マメ科作物への窒素固定能力の付与である。イネやコムギなどの主要穀物に根粒共生能力を付与することは、長年の夢であるが、現実化には多くの課題が残されている。しかし、もし非マメ科作物に根粒形成能力を導入できた場合、AON 機構の理解は、その制御と最適化に不可欠となるだろう。

最近では、合成生物学的アプローチにより、根粒菌の窒素固定能力を向上させる試みも進んでいる。nif 遺伝子の変更により、より効率的なニトロゲナーゼを持つ根粒菌の作出や、酸素耐性を向上させた株の開発などが報告されている。これらの改良根粒菌と、AON 制御を最適化した植物を組み合わせることで、相乗的な窒素固定能力の向上が期待される。

## 第 V 部

### 農業応用への展望

#### 14 期待される効果

超多着生機構の理解と制御技術は、持続可能な農業システムの構築に向けて、多面的な効果をもたらすことが期待されている。ここでは、定量的な試算を含めて、その潜在的効果を検討する。

##### \*\*化学窒素肥料の削減ポテンシャル\*\*

現在、世界の農業では年間約 1 億 2000 万トンの窒素肥料が使用されている。このうち、マメ科作物の栽培面積は全耕地の約 15% を占めるが、適切に根粒共生を利用すれば、理論上はこの領域での化学肥料投入をほぼゼロにできる。

効率的な根粒共生を実現したダイズでは、1 ヘクタールあたり年間 150~200 kg の窒素を生物学的に固定できることが知られている。これは、通常の化学肥料施用量（ダイズで 50~80 kg N/ha）を大きく上回る。仮に世界のマメ科作物栽培で、根粒共生の最適化により化学窒素肥料の使用を 50% 削減できたとすると、年間約 900 万トンの窒素肥料削減が可能となる。

さらに野心的なシナリオとして、非マメ科作物への窒素固定能力付与が実現した場合を考えると、削減ポテンシャルは飛躍的に拡大する。例えば、世界のイネ栽培面積（約 1 億 6000 万ヘクタール）で、必要な窒素の 30% を生物学的窒素固定で賄えるようになれば、年間約 1440 万トンの窒素

肥料削減となる。これは世界の窒素肥料使用量の約 12% に相当する。

**\*\*経済的効果の試算\*\***

窒素肥料の価格は変動が大きいが、2023 年時点での平均価格を 1 トンあたり約 400 ドルとするとき、年間 900 万トンの削減は約 36 億ドルのコスト削減に相当する。途上国の中規模農家にとって、肥料コストは生産コストの大きな部分を占めるため、この削減効果は農業経営の安定化に直結する。

さらに、窒素肥料の製造には膨大なエネルギーが必要であり、窒素肥料 1 トンの製造には約 40 ギガジュール (GJ) のエネルギーが消費される。年間 900 万トンの削減は、約  $3.6 \times 10^8$  GJ のエネルギー節約となり、これは中規模の火力発電所数基分の年間発電量に匹敵する。エネルギー価格の高騰や供給不安定性が続く現代において、この省エネルギー効果の意義は大きい。

**\*\*環境負荷低減効果\*\***

化学窒素肥料の削減は、複数の経路で環境負荷を低減する。

第一に、温室効果ガスの削減である。窒素肥料の製造過程では、主に化石燃料の燃焼により大量の CO<sub>2</sub> が排出される。窒素肥料 1 トンの製造は約 2.5~3 トンの CO<sub>2</sub> 排出を伴うため、年間 900 万トンの肥料削減は、約 2250 万~2700 万トンの CO<sub>2</sub> 削減に相当する。これは、中規模国家の年間 CO<sub>2</sub> 排出量に匹敵する規模である。

第二に、農地からの亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) 排出の削減がある。化学肥料として施用された窒素の一部 (約 1~2%) は、土壤微生物の作用により N<sub>2</sub>O に変換されて大気中に放出される。N<sub>2</sub>O は CO<sub>2</sub> の約 300 倍の温室効果を持つため、その削減効果は大きい。生物学的窒素固定では、植物の需要に応じて窒素が供給されるため、過剰施肥による N<sub>2</sub>O 発生が抑制される。試算では、窒素肥料を 50% 削減することで、農業由来の N<sub>2</sub>O 排出を約 30~40% 削減できる可能性がある。これを CO<sub>2</sub> 换算すると、さらに数千万トンの温室効果ガス削減効果となる。

第三に、水質汚染の低減である。過剰に施用された窒素肥料は、降雨により地下水や河川に流出し、硝酸態窒素による地下水汚染や、富栄養化による水域の生態系破壊を引き起こす。生物学的窒素固定の利用拡大により、この環境負荷を大幅に低減できる。特に、地下水の硝酸態窒素濃度が飲料水基準 (10 mg/L) を超える地域では、健康リスクの低減という直接的便益も期待される。

**\*\*図 9：窒素供給方法による環境影響の比較\*\***

**\*\*作物生産性への効果\*\***

適切に制御された根粒共生は、窒素供給の安定性を高めることで、作物の収量安定化にも寄与する。化学肥料の場合、施用タイミングや量の判断ミス、あるいは降雨による流亡などにより、窒素の利用効率が低下することがある。一方、生物学的窒素固定では、植物の成長段階に応じて継続的に窒素が供給されるため、窒素欠乏のリスクが低減する。

さらに、根粒菌はビタミン B 群や植物ホルモン (オーキシン、サイトカイニンなど) を产生し、植物の成長を促進する効果も報告されている。これらの副次的効果により、単なる窒素供給以上の生育促進効果が期待される。実際、一部のフィールド試験では、根粒共生を最適化したマメ科作物で、収量の 5~15% 向上が観察されている。

## 15 実用化への課題

超多着生機構の農業応用には、克服すべき複数の課題が存在する。

### \*\*マメ科以外への応用可能性と技術的障壁\*\*

最も野心的な目標は、イネ、コムギ、トウモロコシなどの非マメ科主要作物に窒素固定能力を付与することである。これが実現すれば、世界の食糧生産システムに革命的变化をもたらす。しかし、この目標達成には、依然として大きな技術的障壁が存在する。

根粒共生能力の獲得には、少なくとも以下の要素が必要である：(1) 根粒菌を認識し感染を許容する機構、(2) 根粒という新規器官を形成する発生プログラム、(3) 根粒内で窒素固定を支援する生理的機能（レグヘモグロビン産生、微好気環境の維持など）。これらの複雑な形質を非マメ科植物に導入することは、現在の技術では極めて困難である。

ただし、段階的なアプローチは進展している。例えば、イネやトウモロコシに根粒菌の Nod ファクター受容体遺伝子を導入すると、根粒菌に対する初期応答（根毛湾曲など）が部分的に誘導されることが報告されている。また、シロイスナズナ（非マメ科）に根粒形成関連遺伝子を複数導入することで、根粒様の構造を形成させる試みも行われている。これらの研究は、最終目標への道筋を示すものであり、今後 10~20 年での実用化も視野に入っている。

より現実的な短期的戦略として、マメ科作物と非マメ科作物の輪作体系の最適化がある。マメ科作物で固定された窒素は、後作の非マメ科作物にも利用可能であり、適切な輪作設計により化学肥料の大幅削減が可能となる。

### \*\*収量とのバランス最適化\*\*

前述のように、超多着生変異体では根粒数は増加するものの、植物全体の生育は必ずしも向上しない。これは、過剰な根粒形成が植物の光合成能力を超え、地上部の成長に必要な資源が不足するためである。したがって、農業応用には、根粒数と植物生産性のバランスを最適化する必要がある。

この最適化には、複数の要因を考慮する必要がある。土壤の窒素肥沃度、気候条件、作物品種の光合成能力、栽培密度などが、最適な根粒数に影響する。例えば、窒素欠乏土壤では多数の根粒が有利であるが、中程度の窒素を含む土壤では、適度な根粒数で化学肥料を補完するのが効率的かもしれない。

最近の研究では、HAR1/SUNN 遺伝子の発現レベルを調節することで、根粒数を段階的に制御できることが示されている。RNA 干渉 (RNAi) 技術やゲノム編集技術を用いて、HAR1 の発現を野生型の 50~70% 程度に抑制すると、根粒数が 1.5~2 倍に増加しながらも、植物の生育は維持または向上する例が報告されている。このような「微調整」アプローチが、実用化への鍵となる可能性がある。

### \*\*土壤環境と微生物相互作用\*\*

根粒共生の効率は、土壤条件に大きく依存する。特に重要なのが、土壤 pH、水分条件、温度、そして在来根粒菌の存在である。

土壤 pH は根粒菌の生存と活性に直接影響する。多くの根粒菌は中性～弱アルカリ性 (pH 6.5~

7.5) を好むため、酸性土壌ではライム処理などの pH 調整が必要となることがある。また、干ばつや過湿は根粒の形成と機能を阻害する。気候変動により極端な気象現象が増加する中、環境ストレス耐性を持つ根粒共生システムの開発が求められている。

さらに複雑な問題として、土壌中の在来根粒菌との競合がある。多くの農地土壌には既に根粒菌が存在しているが、これらの在来株は必ずしも窒素固定能力が高いとは限らない。改良された高効率根粒菌を接種しても、在来株との競合により、実際に根粒を形成するのは効率の低い在来株という事態が生じうる。この問題に対しては、競合力の高い改良株の開発や、接種方法の工夫(種子コーティング、局所的高密度接種など)が研究されている。

#### \*\*育種への統合と規制対応\*\*

AON 制御技術を実用品種に導入するには、既存の優良形質(収量性、病害虫抵抗性、品質など)を維持しながら、根粒共生能力を改良する必要がある。従来の交配育種では、これらの複数形質を同時に改良するには長い年月(10~15 年)が必要である。

ゲノム編集技術、特に CRISPR-Cas9 システムの利用により、この過程を大幅に短縮できる可能性がある。HAR1/SUNN 遺伝子の特定の領域を標的とした編集により、受容体の感受性を低下させ、適度な超多着生表現型を誘導できることが実証されている。重要なことに、この方法では外来遺伝子の導入を伴わないので、一部の国では従来の育種法と同等の規制で扱われる可能性がある。

ただし、ゲノム編集作物の規制は国によって大きく異なる。米国、カナダ、アルゼンチンなどでは比較的寛容な規制が適用されているが、EU や一部のアジア諸国では厳格な規制下にある。この規制の不統一性は、国際的な種子流通や技術普及の障壁となっており、政策レベルでの調整が求められる。

## 16 現在の取り組み

超多着生機構の農業応用に向けて、世界各地で多様な研究開発プロジェクトが進行している。

#### \*\*ゲノム編集技術の活用事例\*\*

CRISPR-Cas9 技術を用いた AON 経路の変化は、複数の研究機関で試みられている。ダイズにおいては、NARK 遺伝子の特定のエクソンを標的とした欠失変異を導入することで、根粒数が 1.5 ~2 倍に増加し、窒素固定能力が向上した系統が作出された。これらの系統では、野生型と比較して収量低下は見られず、むしろ一部の系統では 5~10

興味深い応用として、「条件的超多着生」の創出が試みられている。これは、環境センシングプロモーターと組み合わせることで、窒素欠乏時にのみ HAR1 の発現を抑制し、窒素が十分な場合は通常レベルの根粒形成を維持するという戦略である。窒素応答性プロモーターと RNAi 構築物を組み合わせた系統で、この概念の実証が進められている。

また、複数遺伝子の同時編集により、より精密な制御を目指す研究も進行中である。HAR1 と KLAVIER の両方を部分的に抑制することで、単一遺伝子の編集よりも安定した表現型が得られることが報告されている。さらに、CLE 遺伝子の発現制御領域を編集し、感染応答性を低下させるアプローチも検討されている。

### \*\*フィールド実証実験の展開\*\*

実験室レベルで有望な結果を示した系統は、実際の農業環境での評価が不可欠である。現在、北米、南米、アジア、オーストラリアなど、複数の地域でフィールド試験が実施されている。

米国の中西部では、NARK 遺伝子を編集したダイズ系統の大規模フィールド試験が進行中である。初年度の結果では、窒素肥料を従来の 50% に削減しても、収量は慣行栽培と同等かそれ以上であった。また、窒素肥料をさらに削減(75% 削減)した場合でも、収量低下は 10% 以内に抑えられ、経済的にも十分な利益が得られることが示された。

ブラジルでは、熱帯気候条件下でのダイズ栽培において、改良根粒共生系統の評価が行われている。熱帯地域特有の高温・多湿条件は根粒機能にストレスを与えるが、AON 経路を緩和した系統では、これらのストレス条件下でも安定した窒素固定が維持されることが観察されている。

アジアでは、ラッカセイ(落花生)を対象とした研究が進められている。ラッカセイは重要な油糧・タンパク質作物であり、多くの途上国で小規模農家により栽培されている。HAR1 相同遺伝子を編集したラッカセイ系統の予備試験では、窒素固定能力の向上と、それに伴う子実タンパク質含量の増加が確認されている。

### \*\*产学連携と国際協力プロジェクト\*\*

AON 機構の農業応用には、基礎研究から実用化まで、多段階の研究開発が必要であり、大学、公的研究機関、民間企業、国際機関が連携したプロジェクトが複数立ち上げられている。

米国では、DOE(エネルギー省)と NSF(科学財団)が共同で、非マメ科作物への窒素固定能力付与を目指す大型プロジェクト「Crops in silico」を支援している。このプロジェクトでは、計算生物学とゲノム編集を組み合わせ、イネに根粒形成能力を段階的に導入する試みが行われている。

欧州では、Horizon Europe プログラムの下、持続可能な農業のための生物学的窒素固定の利用拡大を目指す複数のプロジェクトが進行中である。これらのプロジェクトでは、マメ科作物の輪作体系最適化、改良根粒菌の開発、そしてゲノム編集技術の社会受容性に関する研究が統合的に行われている。

国際農業研究協議グループ(CGIAR)は、途上国の中規模農家を対象とした根粒共生技術の普及プロジェクトを展開している。特にサハラ以南アフリカでは、ササゲ(cowpea)やヒヨコマメなどの在来マメ科作物の根粒共生能力を向上させ、化学肥料への依存を低減する取り組みが行われている。これらのプロジェクトでは、技術開発だけでなく、農民への教育・普及活動も重視されている。

日本では、JST(科学技術振興機構)のCREST プログラムなどで、基礎から応用までの一貫した研究が支援されている。特に、ミヤコグサをモデルとした基礎研究の成果を、ダイズなどの実用作物に橋渡しする「トランスレーショナル研究」に重点が置かれている。

民間企業の参画も加速している。大手種苗会社は、ゲノム編集技術を用いた改良品種の開発に投資を拡大しており、一部の企業はベンチャー企業や大学と共に、特定の遺伝子編集技術のライセンス契約を結んでいる。また、肥料メーカーの中には、化学肥料と生物学的窒素固定を組み合わせた「ハイブリッド施肥システム」の開発を進めているところもある。

これらの多様な取り組みにより、超多着生機構の理解に基づく農業技術は、今後 5~10 年の間に実用化の段階に入ると期待されている。特に、気候変動と人口増加という二つの大きな課題に直面

する 21 世紀において、持続可能で環境調和型の窒素供給システムの確立は、人類の食糧安全保障にとって極めて重要な意味を持つ。

## 第 VI 部 結論

### 17 超多着生機構解明の意義

本レポートでは、根粒菌とマメ科植物の共生における超多着生機構について、その分子基盤から農業応用の可能性まで包括的に検討してきた。超多着生機構の解明は、単に植物生理学における学術的知見の蓄積にとどまらず、持続可能な農業システムの構築という人類社会の喫緊の課題に対する具体的な解決策を提示するものである。

オートレギュレーション (AON) という全身性制御機構の発見と、その分子実体である CLE ペプチド-HAR1/SUNN 受容体系の同定は、植物が複雑な長距離シグナル伝達により器官形成を制御していることを示した画期的な成果である。この機構は、根から地上部へのシグナル伝達、茎頂部での受容と処理、そして地上部から根への抑制シグナルの送信という、多段階の精巧なプロセスから成り立っている。このような全身性制御システムの理解は、根粒共生だけでなく、植物の発生・分化における統合的制御機構の理解にも大きく貢献している。

さらに重要なのは、この基礎研究の成果が、実用技術への橋渡しという段階に到達していることである。ゲノム編集技術の発展により、HAR1/SUNN や CLE 遺伝子を標的とした精密な改変が可能となり、根粒数を人為的に制御できるようになった。これは、数十年にわたる基礎研究の蓄積が、ついに社会実装の段階に入りつつあることを意味する。

### 18 持続可能な農業への貢献可能性

現代農業が直面する環境・エネルギー問題を考えると、生物学的窒素固定の利用拡大は、持続可能性の観点から極めて重要な意義を持つ。本レポートで試算したように、化学窒素肥料の使用を大幅に削減することで、温室効果ガス排出の削減、エネルギー消費の低減、水質汚染の防止という複合的な環境便益が得られる。特に、CO<sub>2</sub>換算で年間数千万トン規模の温室効果ガス削減効果は、パリ協定の目標達成に向けた農業セクターの貢献として重要である。

経済的な観点からも、肥料コストの削減は農業経営の安定化に寄与する。特に、化学肥料の価格変動や供給不安に脆弱な途上国の中規模農家にとって、生物学的窒素固定への依存度を高めることは、持続可能な生計手段の確保につながる。国際的な肥料価格の高騰や、地政学的リスクによる供給途絶のリスクを考えると、各国が自国の生物資源を活用した窒素供給システムを構築することの戦略的重要性は増している。

ただし、技術の社会実装には慎重なアプローチが必要である。ゲノム編集作物に対する社会的受

容性の問題、規制枠組みの国際的調和、そして在来の農業実践との統合など、解決すべき課題は多い。技術開発と並行して、農民、消費者、政策立案者との対話を通じた社会的コンセンサスの形成が不可欠である。

## 19 今後の研究の方向性

超多着生機構の研究は大きく進展したが、依然として多くの未解明の問題が残されている。今後の研究において、特に重要と考えられる方向性を以下に示す。

第一に、地上部由来の抑制シグナルの分子実体の同定である。CLEペプチドが根から地上部へのシグナルであることは明確になったが、HAR1受容体の下流で產生され、根に送られる抑制シグナルの正体は依然として不明である。候補分子として、サイトカイニン、ストリゴラクトン、未同定のペプチドなどが提案されているが、決定的な証拠は得られていない。この「ミッシングリンク」の解明は、AON機構の完全な理解に不可欠である。

第二に、環境応答との統合的理の深化である。窒素栄養状態、リン酸や他の栄養素、温度、水分、光などの環境要因が、どのようにAON経路と統合されて根粒形成を制御するのか、その分子機構の解明が必要である。特に、気候変動により極端な気象現象が増加する中、環境ストレス下でも安定して機能する根粒共生システムの理解と開発は急務である。

第三に、非マメ科作物への窒素固定能力付与という長期的目標に向けた基盤研究の継続である。根粒形成に必要な遺伝子セットの最小セットの同定、それらの遺伝子を協調的に発現させる制御機構の設計、そして非マメ科植物のゲノムへの効率的導入技術の開発など、多くの技術的課題が残されている。しかし、この目標が達成されれば、世界の食糧生産システムに革命的变化をもたらすため、継続的な投資と国際協力が正当化される。

第四に、根粒共生と他の有益な微生物との相互作用の理解である。根圏には根粒菌以外にも、植物成長促進細菌(PGPR)、アーバスキュラー菌根菌、エンドファイトなど、多様な有用微生物が存在する。これらの微生物群集と根粒共生の相乗効果を最大化することで、より効率的で安定した農業システムの構築が可能となるだろう。

## 20 考察と提言

本レポートの作成を通じて、生物学的窒素固定の潜在能力の大きさと、その実用化に向けた研究の進展に強い印象を受けた。特に、基礎研究の着実な蓄積が、ゲノム編集技術という新たなツールを得て、急速に応用段階へと移行しつつある状況は、科学研究の社会的価値を示す好例といえる。

しかし同時に、技術開発だけでは不十分であることも明らかである。持続可能な農業への移行は、技術、経済、社会、政策の各側面が統合的に機能して初めて実現される。この観点から、以下の点を提言したい。

まず、研究開発における「適正技術」の視点の重要性である。超多着生変異体の例が示すように、単に根粒数を増やせば良いというわけではなく、植物全体の生産性とのバランスが重要である。同

様に、先進国向けの高度な技術と、途上国的小規模農家が利用できる簡便な技術では、求められる仕様が異なる。多様な農業環境と社会経済条件に適合した技術開発のポートフォリオが必要である。

次に、在来知識と最新科学技術の融合である。多くの伝統的農業社会では、マメ科作物の輪作や混作による土壤肥沃度の維持が、長年実践されてきた。これらの伝統的実践の科学的理解を深め、現代の分子生物学的知見と組み合わせることで、より効果的で文化的にも受容されやすい技術が開発できる可能性がある。

さらに、教育と普及の重要性を強調したい。優れた技術も、農業現場で適切に使われなければ意味がない。根粒共生のメカニズムと管理方法についての農民教育、普及員の訓練、そして次世代の研究者・技術者の育成に、十分な資源を配分する必要がある。

最後に、国際協力の枠組みの強化を提言したい。気候変動と食糧安全保障は地球規模の課題であり、一国だけで解決できるものではない。研究成果の共有、育種素材の交換、技術移転のための制度設計など、国際的な協調体制の構築が不可欠である。特に、ゲノム編集技術の規制に関する国際的調和は、技術普及の速度を大きく左右する。

人類は、20世紀にハーバー・ボッシュ法という画期的技術により、大気中の窒素を固定する能力を獲得し、それが「緑の革命」と人口爆発を支えた。しかし、その代償として環境負荷の増大という問題に直面している。21世紀の課題は、自然界が数億年かけて洗練してきた生物学的窒素固定というエレガントなシステムを理解し、活用することで、持続可能な食糧生産を実現することである。超多着生機構の研究は、この壮大な挑戦の重要な一部であり、その成果が次世代により良い地球環境を引き継ぐための貢献となることを期待したい。

## 参考文献

- [1] Akao, S. and Kouchi, H. (1992). A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar enrei. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(1):183–187.
- [2] Delves, A., Higgins, A., and Gresshoff, P. (1987). Shoot control of supernodulation in a number of mutant soybeans, glycine max (l.) merr. *Australian Journal of Plant Physiology*, 14(6):689–694.
- [3] Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1):35–59.
- [4] Gremaud, M. F. and Harper, J. E. (1989). Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. *Plant Physiology*, 89(1):169–173.
- [5] Kenjo, T., Yamaya, H., and Arima, Y. (2010). Shoot-synthesized nodulation-restricting substances of wild-type soybean present in two different high-performance liquid chromatography peaks of the ethanol-soluble medium-polarity fraction. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56(3):399–406.
- [6] Kosslak, R. M. and Bohlool, B. B. (1984). Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiology*, 75(1):125–130.
- [7] Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.-C., Shinozaki, K., Nguyen, H. T., and Wing, R. A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278):178–183.
- [8] Yamaya, H. and Arima, Y. (2004). ダイズ小植物体葉身アポプラストへの溶液連続導入法の確立と根粒超多着生形質解明への応用. *日本土壤肥料学雑誌*, 75(6):685–691.