

根粒菌はマメ科植物と共生し、根粒内でバクテロイドへ分化し窒素分子をアンモニアへ還元する窒素固定作用を行う。アンモニアへ還元された窒素分子は植物が利用する。作物生産で最も欠乏する栄養素は窒素であり、そのため古くから興味を持たれると共に、農業上利用されてきた。根粒菌の分類は 19 世紀に開始され、1888 年に Beijerinck は、根粒菌を単離し、根粒菌が生物窒素固定を行うことを報告した。彼は、それら細菌を *Bacillus radicola* と名付けた(Beijerinck, 1888)。その後、Frank は *Rhizobium leguminosarum* と名前を付け直した(Frank, 1889)。

20 世紀に入り、米国の微生物学者の Bergey は、細菌を表現型に基づいて分類するための Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey et al., 1923)の出版を開始した。根粒菌に関しては、グラム陰性・好気性・孢子を形成せず・運動性を持つ桿菌で、同様な表現型を有する土壤細菌とは区別できない。それ故、マメ科植物に根粒を形成する能力が、根粒菌と他の微生物を区別する最も重要な基準となった。1970 年代には、1974 年に出版された Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (第 8 版) (Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974) は *Rhizobium* 属を 6 種記載していた。1980 年代に入り、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の第 1 版が 1984 年に出版されたとき(Kreig, N. R. and Holt, J. G., 1984)、*R. phaseoli* (インゲンマメ根粒菌) と *R. trifolii* (クローバー根粒菌) は *R. leguminosarum* (エンドウマメ根粒菌) に編入され、*Rhizobium* 属は *R. leguminosarum* と *R. meliloti* (アルファルファ根粒菌) 及び Jarvis により提案された新種の *R. loti* (Jarvis et al, 1982) (ミヤコグサ根粒菌) の 3 種のみであった。しかしリゾビウム科には新しく、1 属 1 種ではあったが、*Bradyrhizobium* 属 (ダイズやアズキの根粒菌) が加わった。また、葉粒を形成する *Phyllobacterium* 属の 2 種の細菌 *P. myrsinacearum* と *P. rubiacearum* (Knösel, 1984)が加わった。さらに、1988 年にアフリカのセネガルの *Sesbania rostrata* に茎粒を形成する *Azorhizobium* 属根粒菌がリゾビウム科に新属として記載され(Dreyfus et al., 1988)、ダイズに根粒を形成する生育が早い根粒菌が、1984 年に Scholla と Elkan により *R. fredii* と記載され、その後、1988 年に Chen により *Sinorhizobium* 属という新属に再分類された(Chen et al., 1988)、また Galega (ガレガソウ 牧草) というマメ科植物に根粒を形成する *R. galegae* (Lindstorm, 1989) が記載された。1990 年代には、1992 年にダイズの生育が遅い根粒菌である *Bradyrhizobium japonicum* から *B. elkanii* が新種として区分された(Kuykendall et al., 1992)。

2005 年に出版された Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の第 2 版(Garrity, G. M. et al., 2005) では、根粒菌は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の違いに基づく幾つかの異なる系統に区分された。それらの遺伝的に異なる根粒菌群は、 α プロテオバクテリア綱に新規に作成されたリゾビアレス目に幾つかの科として分類された (Kuykendall et al., 2005)。

過去 9 年くらいの間、現在まで根粒菌として報告がなかった α と β プロテオバクテリアの細菌で、マメ科植物の根に根粒を形成し共生窒素固定を行う微生物が多数報告されてきた。具体的には、 α プロテオバクテリア綱に属する *Devosia neptuniae* はインドの *Neptunia natans* (ミズオジギソウの一種) から単離され(Rivas et al., 2002)、*Crotalaria* (タヌキマメ) から *Methylobacterium nodulans* が単離された(Jourand et al., 2004)。また、*Lupinus sp.* から *Ochrobactrum lupinus* が見いだされ (Trujillo et al., 2005)。

β プロテオバクテリア綱に属する *Burkholderia* 属には、植物病原菌、土壌細菌、植物と相互作用する細菌、ヒトに病気をおこす細菌等 20 種以上が含まれているが、現在までに *Mimosa* から単離された 2 株の *B. caribensis*、*Alysicarpus* (ササハギ) から単離された 1 株の *B. cepacia* (*B. dolosa* に学名が変更されている)、*Machaerium* から単離された 1 株の

B. phymatum 等がある (Moulin et al., 2001; Vandamme et al., 2002)。また、*Ralstonia* 属細菌は、*Burkholderia* 属と同様に植物病原菌、土壌細菌、植物と相互作用する細菌、ヒトに病気をおこす細菌等を含んでいる。そして、Chen らは、台湾の *Mimosa* 属の植物種から *Ralstonia taiwanensis* に属する根粒菌を報告した (Chen et al., 2001)。

以上概略したように、現在の根粒菌は、 α と β プロテオバクテリアに分類される非常に大きなグループになっている。特に、2000年代に入り、現在まで解析されなかった多様なマメ科植物の根粒菌の解析で、遺伝的な多様性が拡大している。

ところで、ジーンバンクが保存しているMAFF根粒菌株は、石沢修一博士や蒲生琢磨博士、澤田泰男博士等が、日本やアジア各地を探索し、様々なマメ科植物から採取した根粒菌が含まれている。H21年度からMAFF根粒菌株等の分類検証を行ってきた。特に、上記の博士達が集めて、*Brsdyrhizobium* sp. あるいは *Rhizobium* sp. と記載されている株を中心に再検証を試みた。*Bradyrhizobium* sp. と記載されているフィリピンのシカクマメの根粒から単離されたMAFF210201, インドシタンから単離された210202株は16s-rRNA遺伝子の塩基配列に基づく *Ralstonia* 属および *Rhodospirillum* 科細菌に分類され、沖縄県のタヌキマメの根粒から採取されたMAFF210188株は *Staphylococcus* 属に分類された。タンザニアのロトノニスの根粒から単離されたMAFF2101491株は *Methylobacterium* 属細菌と推定され、ニューギニアのオオバフジボグサやナンバンアカバナアズキから単離されたMAFF210533株, MAFF210534株は *Ralstonia* 属と *Bacillus* 属に分類された。分析結果が得られたとき、これらはコンタミかと最初は考えたが、先達者がMAFF根粒菌株と登録しているからには、根粒菌である可能性が高いと考えさらに検証を進めた。H22年度とH23年度に根粒形成遺伝子群や窒素固定遺伝子群の存在の探知及び幾つかの植物への接種試験を試みた。MAFF210188株 (*Staphylococcus* sp.), MAFF210201株 (*Ralstonia* sp.), MAFF210202株 (*Bacterium* sp.), MAFF210491株 (*Methylobacterium* sp.), MAFF210533株 (*Ralstonia* sp.) に関しては、それら菌株に根粒形成遺伝子と窒素固定遺伝子が存在するかPCR法で検証した。*nodA* や *nodD* 遺伝子は種や属で遺伝子配列が大きく異なるため、PCRによる各遺伝子断片の増幅には、*Sinorhizobium* に基づく共通性の高いプライマーを使用した。その結果、*nodA* 断片はMAFF210188株 (*Staphylococcus* sp.) と MAFF210202株 (*Bacterium* sp.) で確認され、また、*nodD* 断片はMAFF210188株 (*Staphylococcus* sp.), MAFF210201株 (*Ralstonia* sp.), MAFF210202株 (*Bacterium* sp.), MAFF210491株 (*Methylobacterium* sp.) で確認された。さらに、窒素固定に必須のニトロゲナーゼ構造遺伝子である *nifD* 断片の増幅を試みた結果、MAFF210188株 (*Staphylococcus* sp.), MAFF210201株 (*Ralstonia* sp.), MAFF210491株 (*Methylobacterium* sp.), MAFF210533株 (*Ralstonia* sp.) の4株で *nifD* 遺伝子断片が確認された。次に、幾つかのマメ科植物への接種試験を計画した。多様なマメ科植物の根粒から得られた菌株であるので、オリジナルの植物で接種試験を行うことがベストであるが、それらの種子を手に入れることは不可能に近く、これまでの経験から宿主域が広そうなマングビーンとサイラトロを試験植物に設定し、接種試験を行った。その結果、MAFF210188株 (*Staphylococcus xylosum*), MAFF210201株 (*Ralstonia solanacearum*), MAFF210202株 (*Rhodospirillum* 科細菌), MAFF210491株 (*Methylobacterium* sp.), MAFF210533株 (*Ralstonia pickettii*)、MAFF210534株 (*Bacillus pumilus*) は、マングビーンとサイラトロに根粒を形成し、新規の根粒菌と推定された。さらに、上記の博士達が多様なマメ科植物の根粒から単離し、*Brsdyrhizobium* sp. あるいは *Rhizobium* sp. と記載した菌株は、今回の分類検証で、多数の *B. japonicum* や *B. elkanii* へ再分類されたが、それらの菌株をダイズ、マングビーン、サイラトロへ接種した結果、驚いたことにダイズへは殆どの株が根粒を形成できず、ダイズ根粒菌とは宿主選択が大きく異なることが分かった。このように、先達者達が世界各国のマメ科植物の根粒から単離して寄託したMAFF根粒菌株群は、現在の分類体系における新規根粒菌を多数含んでおり、詳細な研究が進むと、世界の根粒菌分類研究等に大きく寄与できる可能性を有している。H24年度の検証においても、フィリピンのモダマから単離し *Bradyrhizobium* sp. として登録されているMAFF210191株は、*Labrys ginsengisoli* と判定され、新種の根粒菌の可能性があり、さらなる検証が望まれる。