

## 土壤微生物群集の多様性と動的安定性が生み出す排多的振る舞い

農業技術研究機構 北海道農業研究センター 横山和成

### はじめに

「21世紀は生物学の世紀」これはかつて我が国のある高名な物理学者からお聞きした言葉である。しかし、「ただしそれは物理学者がする生物学である」だそうである。自分が何学者かの分類に興味はないので、この場にももの申す資格があるか否かはともかく置くとして、農業生産の現場で、生産性の高い土壤改良、所謂「土作り」と土壤微生物群集との関係を泥んこになって模索する筆者にとって土壤微生物群集は将に「大自由度進化系」である。その稚拙な取り組みと思索が読者の何かのお役に立つことを祈ってここに紹介する。なお、挿入図は研究会で使用したそのまま用いた。

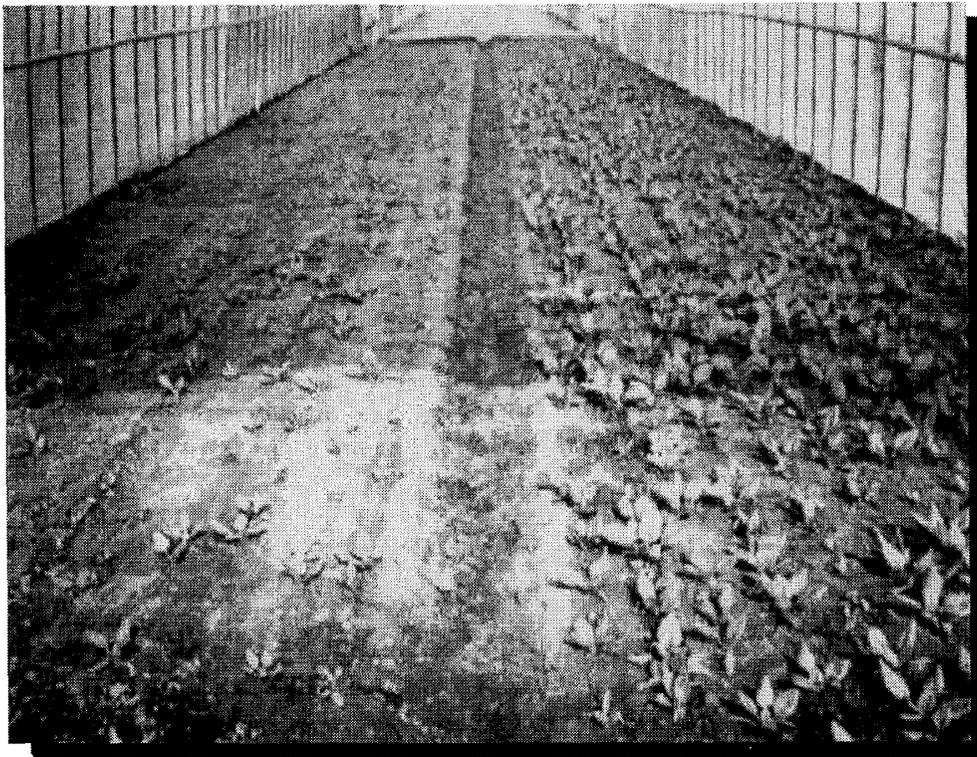


図1. 連作障害が激発するホウレンソウ畑

中央通路右：  
土壤消毒済み  
中央通路左：  
未消毒

連作によって  
土壤中に蓄積  
した病原菌に  
よりホウレン  
ソウは枯死す  
る。

図1をご覧頂きたい。岐阜県飛騨地方のホウレンソウ栽培施設内を撮影したものである。中央から左右でホウレンソウの繁茂程度が大きく異なっている。原因は、毎年同じ土壤で同じ作物を栽培する（連作）ことにより蓄積した病原菌が、ホウレンソウに病害（連作障害）を引き起こしたためである。しかし、当地には同じように連作しても連作障害を引き起こさない土壤（連作障害抑止型土壤）が存在する。この連作障害抑止型土壤が何故病原菌の蓄積を引き起こさないのか、多くの科学的探求がなされ、病原菌の蓄積を抑制する特殊な微生物が探索されたが未だに結果は得られていない。その原因は以下に述べる土壤微生物群集の厄介な特質による。

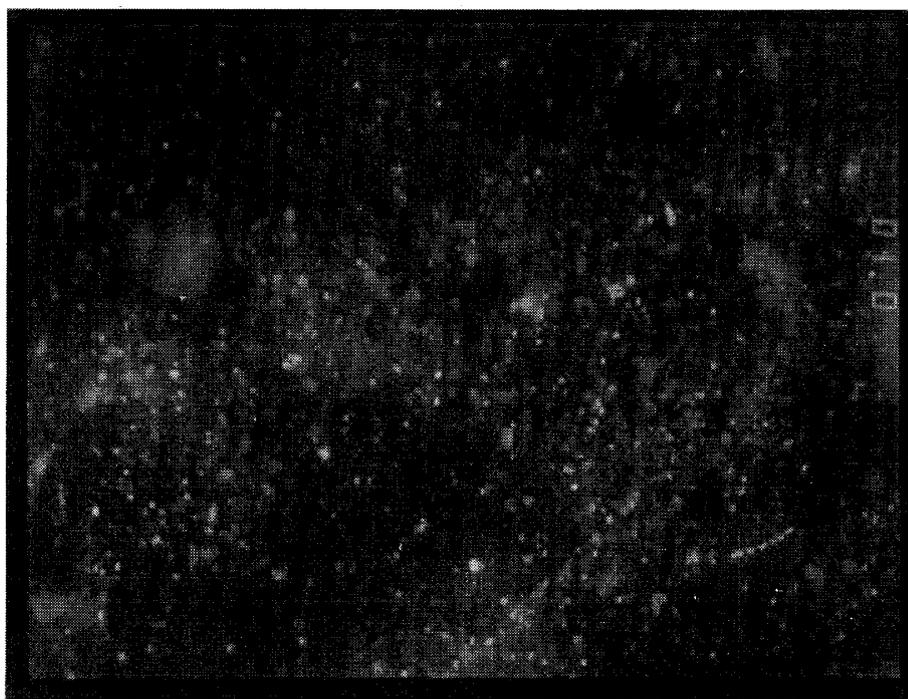


図2. 土壌懸濁液を核酸特異染色剤D A P I で染色した土壌懸濁液の蛍光顕微鏡像  
明るい点が細菌細胞

### 科学的に見えない世界

土壌微生物には、大きさ順に糸状菌、酵母、放線菌、細菌、ウイルスが含まれるが、今回取り上げるのはその中で最も多数である細菌である。一般に土壌の中にはどれ程の数の細菌が居るのか、それを調べるために土壌を水に懸濁し、適宜希釈した後顕微鏡観察すると極一般的な土壌1グラムに約 $10^{11}$ 個の細菌細胞が観察できる(図2)。土壌1グラムの体積が1立方センチメートル、細菌細胞の体積が約1立方マイクロメートルとすると、 $10^{11}$ 個の細胞は1グラムの土壌の体積比にして約10%を占めることになる。このことは土壌の母剤である鉱物粒子を除くとその殆どが微生物由来成分で占められていることになる。将に土壌は微生物の犇めく世界と言える。

土壌微生物が植物の栄養吸収に必須の役割を演じることを考えると、土壌改良のためにはその生物要素の主体である微生物群集を明らかにする必要があるが、土壌微生物群集は長年ブラックボックスとされてきた。その主たる原因は前述した数の多さである。しかも微生物の当然の特質として小さすぎて肉眼で捉えられない、さらに外形的には均質で観察のみではそれが何であるかを特定できない。そのため、培養という手段を用いて土壌から分離し、増殖して理化学的性質を詳しく調べることでそれが何であるか同定する。しかし、先ず顕微鏡観察された数のうち培養して分離可能なものは約 $1000$ 分の1である。何故培養できないのかも定かでないが、培養された細菌の種名を特定するためには1菌株あたり2ヶ月を要する。しかも、殆どが未知種である。つまり、土壌の生物的性質を決定している土壌微生物のうち最多数者の細菌のみをとっても、科学的常套手段である、「何がどれだけの数」を決定することが事実上不可能な「科学的に見えない」世界なのである。

### 分類群非依存型多様性概念

微生物以外のマクロな生物の生態系など解析的に扱うことが困難な系を「多様性」のレベルによって特徴づけられている。しかし、その為に一般に用いられる「分類群依存型多様性」概念は、集団を構成する構成者が所属する分類群の多さとそこに所属する構成者の数の偏りにより構成されている。従って、土壌から分離される未知の細菌集団の多様性を従来の多様性概念で評価しようとする、「種」あるいは「属」といった何らかの分類群に所属させる必要がある。しかし、土壌細菌群集の場合、前述のように分類学的情報不足、あるいはそれを得るために多大の労力のため、分類群自体が不明瞭であり、それへの当てはめが不可能である。このことから、分類群形成と当てはめを要しない新しい多様性概念が必要と考えられた。

新たに構築された概念「分類群非依存型多様性：性質の違い（距離）がより大きい構成者をより多く有している集団は、性質が互いに類似した（相互の距離が小さい）少数の構成者を有する集団より多様である」では、集団の構成者間の違いのみに着目し構成者の分類群に所属を要求しない。従って分類群所属の際に必ず生じる「境界問題」つまり分類過程で操作上引かれる境界線が世界の見え方を一変させる問題を発生させない。この概念を数値化するために、性質の違いとして細菌の性質をクラスター分析したときに決定されるクラスター間距離を用い、集団のもつ総クラスターと構成者間の平均クラスター距離の論理積に比例する多様性尺度（多様性指数）を算出する以下の式を試作した（図3）。

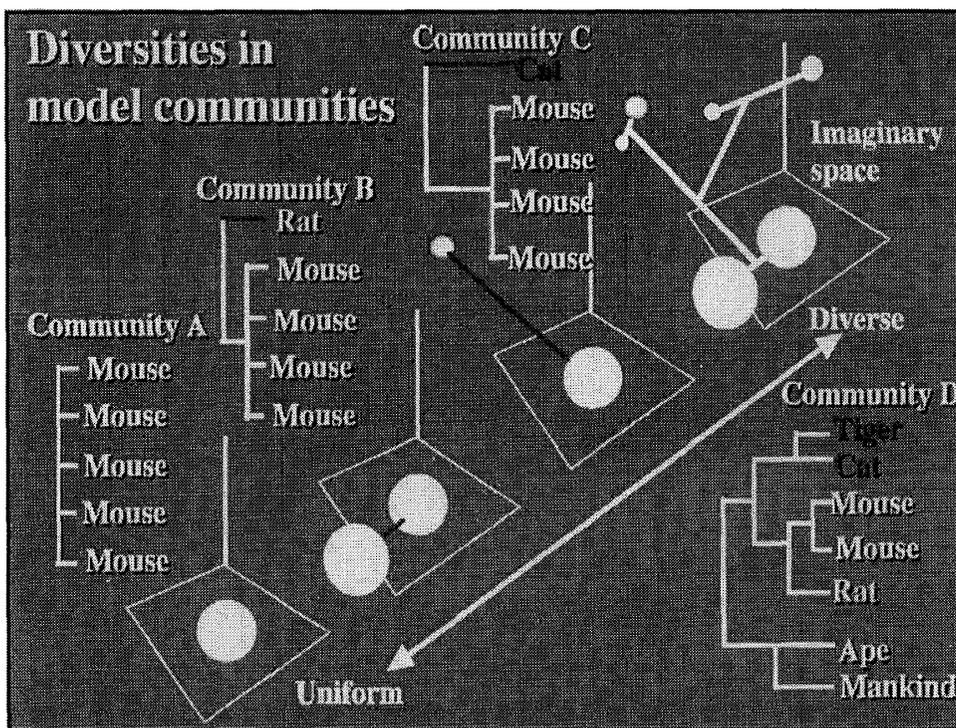


図3. 分類群非依存型多様性概念

集団の多様性の高さは、構成者の分類群ではなく構成者間の距離のみに依存する。そのため、MouseとRatとの間に人為的に引かれる境界の影響（Community A, B間）、RatとCatが共に一種、一個体（Community BとC）として同等に扱われる認知上の不具合を回避できる

$$\begin{aligned} \text{多様性指数} &= \text{集団のクラスター距離の総和} \times \text{平均クラスター距離} \\ &= \text{集団のクラスター距離の総和の二乗} / \text{構成者数} \end{aligned}$$

## 評価システムの開発

我々のグループでは、システムの利用場面や土壌微生物群集の可変性を考慮し、評価手法は出来る限り簡便で、迅速に行えることが必要と考え、土壌から一定数無作為に分離される細菌の細菌学的性質を検出し、そのパターンの多様性から母集団の細菌群集の多様性を評価すること試みた。

細菌学的性質としては、種の同定時の根拠にも利用される炭素源の利用能を用いた。炭素源利用能の簡便で迅速に検出するためには、結果の精度、再現性、汎用性について広く検討が進んでいる BIOLOG 社製プレートと検出用ソフト MicroLog 3N を用いた。得られたパターンを UPGMA アルゴリズムを用いてクラスター分析し、集団の有するクラスター間距離に基づいた多様性指数を算出した（図4）。本法を用いることにより、約1週間で土壌の微生物群集を多様性のレベルで評価することが可能になった。

### 微生物群集の病原菌生育抑制機能

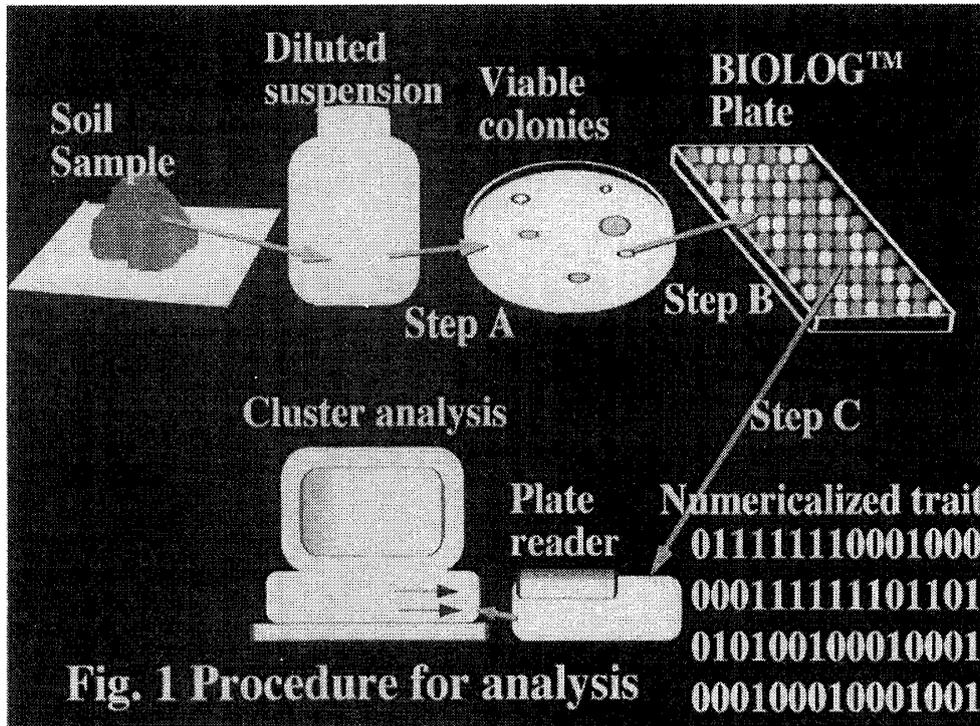


図4. 微生物多様性評価システム行程図

評価は、土壌細菌のうち評価用培地上にコロニーを形成し（StepA）、かつ無作為にサンプルされた（StepB）細菌について、炭素源利用パターンを自動計測する（StepC）それぞれの炭素源の利用可否を1/0の二値情報として表す。

開発した手法を用いて前述の連作障害激発土壌と抑止型土壌の細菌群集多様性を調べた結果が図5である。抑止型土壌では激発土壌と比べて約2倍の多様性を有しており、同じ土壌を2年に渡って調べた結果、多様性の高さや発病程度との関係は保存されていた。そこで、それらの土壌を採取し、実験室内でそれら土壌内での病原菌の生育速度を比較した。その結果、多様性の高さや病原菌の生育抑制効果の間に正の相関があることが分かった。さらには、同一の土壌細菌群集を段階的に希釈することによって、病原菌の生育抑制効果は明らかに低下したことから、土壌微生物群集による病原菌の生育抑制効果は、土壌の来歴に関係なく土壌微生物群集の多様性の高さや、微生物数の両方に比例することが明らかになった（図6）。

以上の様に、土壤微生物群集は病原菌の土壤中での爆発的増殖を抑制する機能があることが

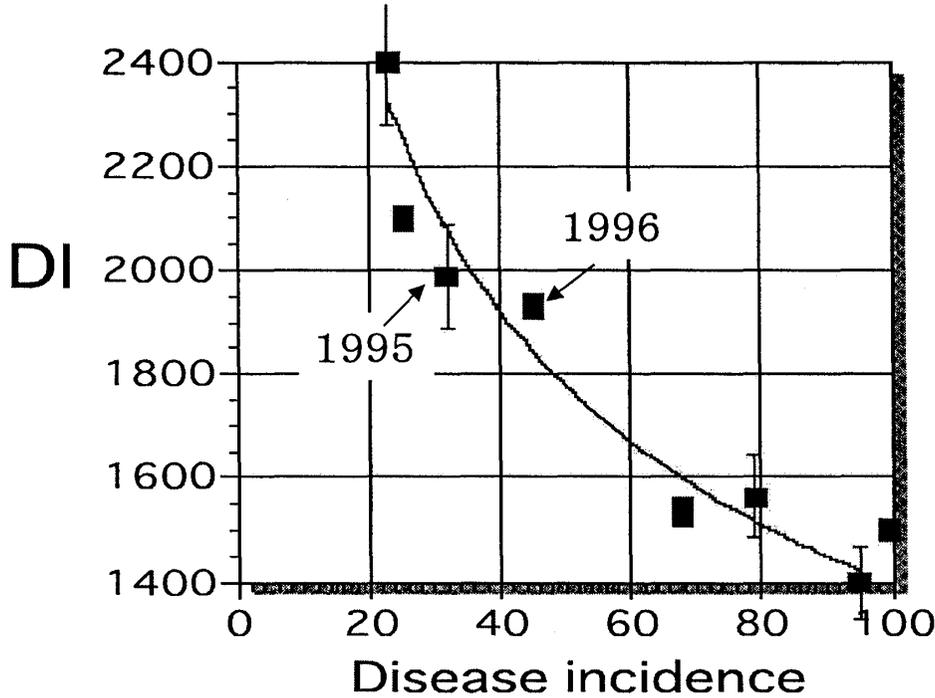


図5. 岐阜県飛騨地方のハウレンソウ連作畑土壤の細菌群集多様性(縦軸)と連作障害発病程度(横軸: 0が無発生、100が全個体枯死)

分かる。しかし、その機能を特定の微生物構成に還元して説明することは現在まで成功されていない。今回紹介した試みと結果のユニークな点は、群集の機能を特定の微生物構成に還元することなく、群集の有する多様性つまり系の複雑性のみで説明させている点である。現在のところ微生物群集を多様性のみで測る試みは微生物学者には支持されていない。多様性と抑止性の興味深い関係は認識され始めているが、最終的には多様性の高い群集を特徴付ける特定微生物を明らかにすることを要求すると言う不合理を止めようとしな。筆者らは逆に、土壤から何ら微生物を取り出さずに測定可能な全く新たな微生物群集の概念化を行うことにより、更に時間分解能の高い群集構造と機能の測定手法開発を目指しているところである。

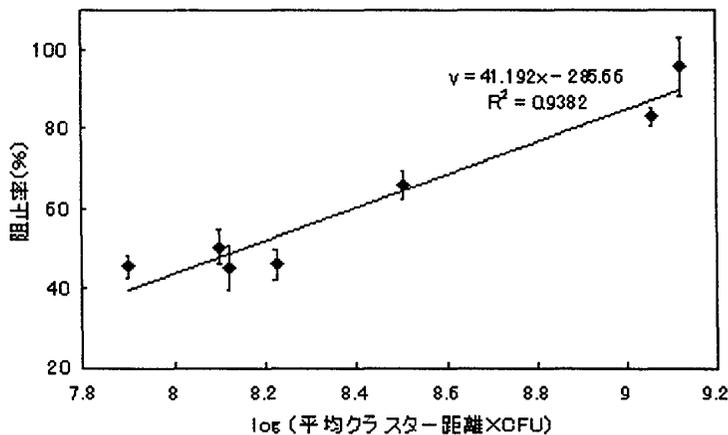


図6. 土壤細菌群集の細菌菌量と多様性の病原菌生育抑制能との関係

土壤細菌菌量(CFU)と多様性(平均クラスター距離)の積はその中の病原菌生育抑止率(無菌状態での病原菌生育量に対する生育抑止率,%)は高い対数相関を示す。

## おわりに

昔父から「七曲がりの松」と言う真偽定かならぬ禅問答話を聞かされたことがある。京の街角に有る至極枝振りの良い松を「真っ直ぐに」観ることが出来たら黄金10枚と言う將軍様の高札に、京の人々は盛んに松を彼方此方から眺め回したと言う。しかし名高い枝振りの松である、どう逆立ちしたって真っ直ぐになど見えるはずがない。ほとんど諦めかけた時、その話を聞いた晩年の一休和尚が巻紙になにやら書いて「これで黄金を貰ってこい」と小僧に渡したとか。さてその紙に何と書かれていたか？答えは「曲がり曲がり曲がって候」だったと言うのだ。つまり、曲がった松を真っ直ぐ見ると言うことは「曲がっている」と言うことだと言うのだ。

翻って、1グラム1兆個以上の微生物の固まりをどう「真っ直ぐ見るか」。現在の我々に突きつけられた問題である。大自由度で複雑な系を特殊な微生物によって代表させる精緻な世界観は真っ直ぐ見ることなのか、私は「大変複雑で常に動いている」と答えることだと考えている。複雑さの程度と動きの違いで表せば良いのだと。本当に真っ直ぐ見ることが出来た時、初めて自然は私たちに謎の一端を見せてくれると期待している。それが私にとっての最大のご褒美なのである。

ちなみに、一休さんの話には落ちがある。高札の裏には小さい字で「ただし一休は除く」と書かれていたそうである。敵もさる者である。

(世話人註： 本論文原著はカラー図版入りでしたが、編集の都合上本稿はモノクロ図版とさせていただきます。カラー図版入りの版はホームページ

<http://www.wacty.phys.sci.osaka-u.ac.jp/~tokita/YIP2001.html>

からダウンロードすることができます。)