

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：55503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14642

研究課題名(和文)菌根菌検査方法の開発

研究課題名(英文)Development of technique for observing mycorrhizal fungi

研究代表者

石井 孝昭 (ISHII, Takaaki)

徳山工業高等専門学校・その他部局等・研究員

研究者番号：30136296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：菌根菌、特にほぼ全ての植物と共生するアーバスキュラー菌根菌(AMF)は自然環境の維持や安心・安全で持続可能な作物生産の構築に非常に重要な役割を果たしている。しかしながら、菌根共生を観察する標準的な方法は非常に煩雑であるとともに、AMFと根の組織を明確に区別することが難しい。最近、筆者らは菌根共生に關与する24 kDaのタンパク質からフルオレセイン標識抗体の開発に成功した。この抗体を用いた菌根菌検査薬は蛍光顕微鏡下で様々な菌根菌を容易に検出できる。そこで本研究では、本検査薬を用いた新開発の携帯型蛍光顕微鏡装置を作り上げ、菌根菌を簡便に観察できる新技术を確立した。

研究成果の概要(英文)：Mycorrhizal fungi, particularly arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that infect almost all of the plants, play a very important role for the maintenance of natural ecology and the construction of safe, secure and sustainable crop production. The standard procedure to observe root colonization, however, is cumbersome, and various light microscopical techniques are required to clearly distinguish between AMF and root tissues. Recently, the fluorescein-labeled specific antibody against 24 kDa protein related to mycorrhizal symbiosis was developed. The new antibody was successfully used to detect various kinds of mycorrhizal fungi in fluorescence microscopic observation. In this study, we developed new technique for observing mycorrhizal fungi easily by using a newly developed portable fluorescence microscope with the detection reagent.

研究分野：果樹園芸学 土壤微生物学 クロマトグラフィー

キーワード：菌根菌 菌根共生タンパク質 菌根菌検査薬 携帯型蛍光顕微鏡装置

1. 研究開始当初の背景

(1) 菌根菌の中で、外生菌根菌系は一般に白く、肉眼で容易に判別できるが、他の菌根菌の菌系はほぼ透明で観察しにくい。そのため、トリパンブルーなどの染色液で菌を染めて観察する方法がとられているが、非常に煩雑である。そのためか、作物栽培において菌根菌の働きが極めて重要であることが知られながらも、菌根菌の有無を踏まえた生育調査や機能性成分などの品質調査などがなざりになっているのが現状である。特に、アーバスキュラー菌根菌 (AMF) はほぼ全ての植物に感染するので、この菌の簡便な観察方法の開発が切望されている。10 数年前、筆者らは菌根共生に関与するタンパク質、特に 24 KDa のタンパク質を発見した (石井ら, 1999)。しかし、当時の技術ではこのタンパク質を分離するのが難しく、大量に得ることができなかった。

(2) 最近、本研究代表者は Diol というクロマトグラフィー用充填剤がゲルろ過作用だけでなく、いくらかのイオン交換能を有していることに気づき、この充填剤を用いたグラジュエント法による HPLC で、24 KDa のような比較的 low molecular weight のタンパク質を大量に分取できる技術を確認した (Matsubara and Ishii, 2015)。この分取技術の開発で、このタンパク質を大量に得て、抗体を作製し、その抗体に蛍光物質を標識させた菌根菌検査用試薬の開発に世界に先駆けて成功した (未発表)。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、農業現場などでも簡便に菌根菌を観察できる携帯型蛍光検出装置を開発し、本試薬を用いた菌根菌観察のための新技術を確立した。

(2) また、これまでの結果から代表的な植物病原性糸状菌の中で、ラン型菌根菌と同属の *Rhizoctonia solani* だけが蛍光を発したことから、本装置で *R. solani* と AMF を区別できるか否かも検討した。

3. 研究の方法

(1) 菌根共生に関与する 24 KDa のタンパク質は AMF、外生菌根菌、エリコイド菌根菌およびラン型菌根菌のいずれにも共通して存在するので、本試薬 (図 1) はいずれの菌根菌にも使用できる。



図 1 菌根菌検査薬

(2) その使用方法として、スライドガラスに各植物の根先端部約 10 mm を置き、この試薬を 10 μ l 程度滴下し、カバーガラスで押しつぶした後、本研究で開発した世界初の携帯型蛍光顕微鏡装置のプロトタイプ (顕微鏡用レンズ付き) (相馬光学とモレキュラーデバイスジャパンとの共同開発) (励起光: 472 nm) (図 2) で根の菌根菌の感染状態を調査した。



図 2 携帯型蛍光顕微鏡装置プロトタイプ

4. 研究成果

(1) 図 3、4、5、6、7 および 8 に示すように、本試薬と新開発の蛍光検出装置の利用によって、様々な植物の菌根共生を容易に観察でき、蛍光強度の測定から根の菌根感染程度も簡便に測定できた。興味深い結果として、菌根菌が感染しないと言われているアブラナ科のコマツナ (品種: ピノグリーン) およびカヤツリグサ科のハマスゲにおいてさえも AMF 共生がはっきりと観察された (図 6)。また、ブルーベリーではエリコイド菌根菌の特徴である根細胞内にコイル状の菌糸や顆粒などを簡便に認識できた (図 7)。

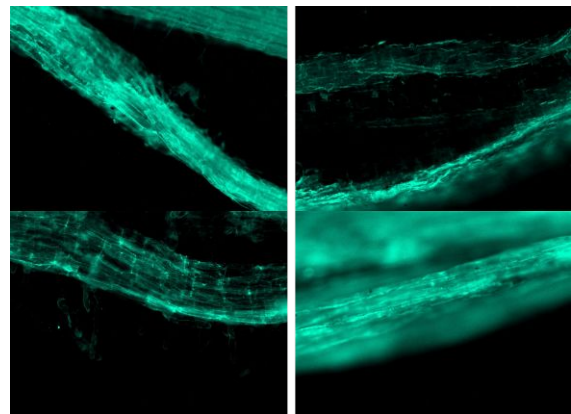


図 3 各植物の AMF 共生

左上: トウモロコシ、右上: ダイズ
左下: キュウリ、右下: レタス

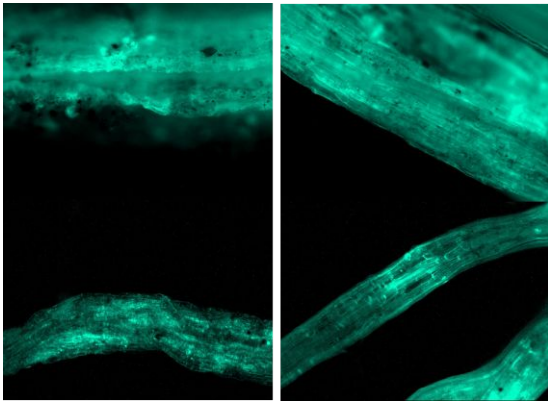


図4 各植物のAMF共生
 左上：ニンジン、右上：ニンニク
 左下：ペパーミント、右下：ペラルゴニウム

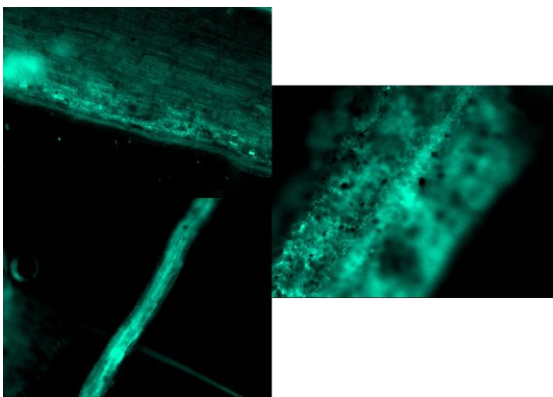


図5 各植物のAMF共生
 左上：ギンネム、右：カラタチ
 左下：ヘビイチゴ

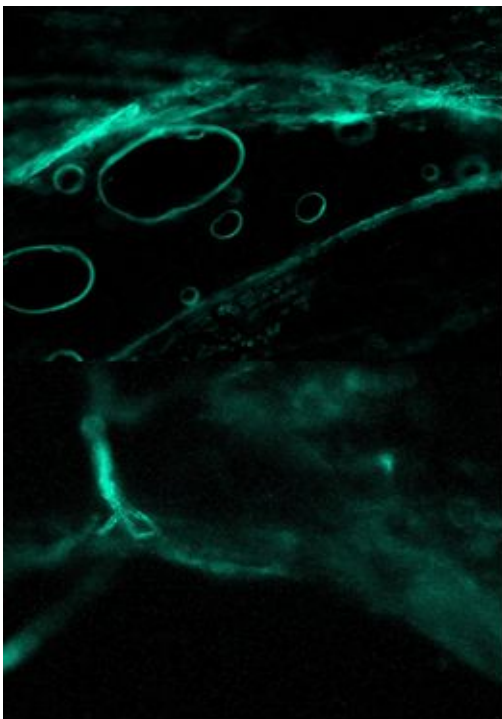


図6 コマツナ(アブラナ科)(上)およびハマスゲ(カヤツリグサ科)(下)におけるAMF共生

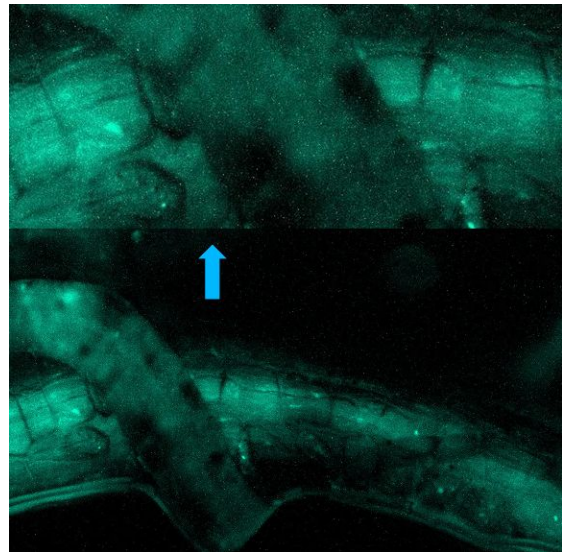


図7 ブルーベリーにおけるエリコイド菌根共生

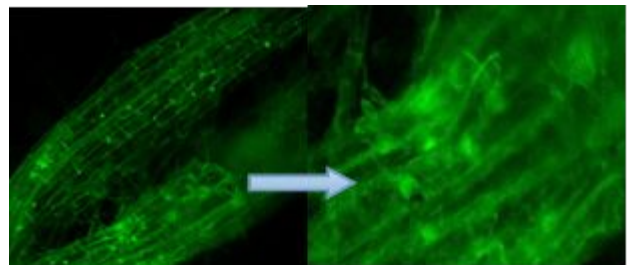


図8 キクにおけるAMF共生

拡大図(右図): 菌糸に隔壁がみられない

(2) また, AMF と *R. solani* の区別を撮影画像における隔壁の有無で容易に判別できた(図8)。

(3) このように, 本技術によって菌根菌の観察が非常に容易に行えるようになったことから, AMF の働きを踏まえた研究が飛躍的に進展することが予想される。特に, この技術は, 菌根菌の存在がなくしては成り立たない, 安心・安全で持続可能な有機あるいは化学肥料や農薬を大幅に削減した作物生産体系を推進する上で, 大いに貢献すると考えられる。

<引用文献>

石井 孝昭、池田 津夕美、K. L. Rutto、A. F. Cruz、松本 勲、門屋 一臣、VA菌根菌 - 植物間の共生メカニズムに関するタンパク質の探索、園芸学会雑誌、68巻(別2)、1999、229

Matsubara, T. and T. Ishii, Development of preparative chromatography for proteomic approach of mycorrhizal symbiosis、Advances in Biological Chemistry、5巻、2015、16-23

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

石井 孝昭、天内 和人、菌根菌観察のための新技術、園芸学研究、査読無、15巻(別2)、2016、218

Ishii, T. and K. Amanai, New technique for observing mycorrhizal fungi、Acta Horticulturae、査読有、受理(印刷中)
<http://www.ishs.org/>

〔学会発表〕(計1件)

石井 孝昭、天内 和人、菌根菌観察のための新技術、園芸学会、平成28年9月10日~9月12日、名城大学(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 孝昭 (ISHII, Takaaki)
徳山工業高等専門学校・その他部局等・
研究員
研究者番号：30136296

(2)研究分担者

天内 和人 (AMANAI, Kazuhito)
徳山工業高等専門学校・一般科目・教授
研究者番号：20390502

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()