

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08110

研究課題名(和文) 樹木における重金属集積への内生菌の関与と樹木内ネットワークの解明

研究課題名(英文) Investigation of involvement and in-tree networks of endophytes in heavy metal accumulation in trees

研究代表者

富岡 利恵 (Tomioka, Rie)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40456588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 広範囲におよぶ重金属汚染土壌の土壌浄化や汚染拡大防止のために、重金属集積植物を利用したファイトレメディエーション技術の確立を目指し研究を行っている。本課題では、樹木と菌との相互作用を利用した樹木の重金属集積やストレス耐性向上を図ること目的に、樹木の金属集積特性と樹体に内生する糸状菌との関係性について理解を深めるための調査を行った。

本課題の研究結果より、タカノツメの葉内は展開初期には様々な菌が存在するが、葉の成熟とともに2-3種類が優占することが分かった。これらの種は広範囲の種に病原性を持つものであるが、タカノツメは葉内の亜鉛濃度を高くすることで、これらの病原性を抑制していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、重金属集積樹木がなぜ特定の金属を他の植物が必要とする以上に集積するのか、という学術的疑問についての知見を得られたと考えられる。タカノツメから得られた研究の結果は、亜鉛による微生物の病原性抑制を示していると考えられる。また、リュウブの研究からは、植物が様々な環境に適応するために、それぞれの環境にある金属を有益に利用し、植物自身のストレス耐性を高めていることを示唆する結果や集積した金属の種類によってその蓄積メカニズムが異なることが明らかとなった。本課題研究の結果は、生体を維持するシステムは植物種によって様々な異なることを示していると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have been researching for establishment of phytoremediation technology using heavy metal accumulation trees for soil remediation and prevention of the spread of pollution of heavy metal contaminated soil in a wide area. In this project, in order to improve the heavy metal accumulation and stress tolerance of trees by utilizing the interaction between trees and fungi, we tried to understand the relationship between the metal accumulation characteristics of trees and the filamentous fungi that inhabit the tree.

From the results of this project, it was found that there are various fungi in the leaves at the early stage of development of *Gamblea innovans* leaves, but only 2 to 3 species dominated as the leaves mature. Although these species are pathogenic to a wide range of plant species, it was thought that *G. innovans* has suppressed their pathogenicity by raising and maintaining zinc concentration high in its leaves.

研究分野：境界農学

キーワード：重金属集積 タカノツメ リュウブ 内生糸状菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

採鉱、製造工業、集約的農業、都市活動など多様な人間活動に伴い、土壌に対して多大な重金属汚染が広がり世界的に深刻な問題となっている。重金属は分解・消失がないため、土壌からの重金属の除去、拡散抑制が求められる。重金属汚染された土壌の浄化法の一つとして、植物の金属蓄積特性を活かしたファイトレメディエーションがある。このファイトレメディエーションは物理的または化学的な手法を用いた浄化法よりもコストが安く、汚染された現地で浄化できるという利点だけでなく、植物の根が張ることによって土壌が安定化し、汚染粒子の二次的拡散を防ぐ。また、植物の地上部組織である葉の健康状態をモニターすることや、サンプル採取が容易であるため、化学的処理法や微生物を利用した浄化法と比較して、汚染金属の状況を把握しやすい。さらに、ファイトレメディエーションに利用する植物は重金属を組織特異的に集積するため、金属を高濃度に集積した組織を取り除いた後、木であれば材やパルプ、バイオエネルギーとして活用することができ、汚染地域の管理運営の財政的な助けとなりうる。また、重金属汚染された土壌に植物が植栽されることで、根から分泌される有機物の働きや脱落した根が土壌微生物の栄養源となり、土壌環境の回復を助けることができ、汚染地域の植生回復に貢献する。

ファイトレメディエーションへの利用に向けた植物研究の多くは重金属集積植物の探索と、重金属集積植物の持つ重金属に対する耐性や集積機構の解明に力が注がれており、申請者らも森林樹木に関して、ファイトレメディエーションへの応用を目指し研究を続けてきた。申請者らがこれまで取り組んできた樹種に落葉低木のタカノツメとリョウブがある。タカノツメは主に Cd, Zn, Mn を、リョウブは Ni, Co, Mn, Zn, Cd を集積する。これらの樹種は日本各地に生育しており鉱山跡地などの重金属濃度の高い土壌でも、そうでない土壌でも生育可能で、地域の生態系への負の影響が少なく、鉱山跡地や物理的汚染土壌除去が難しい広範囲におよぶ汚染地域への活用が期待できる。

2. 研究の目的

重金属集積樹木（タカノツメ、リョウブ、コシアラブ）の微生物の共生関係を利用した効果的なファイトレメディエーション法の確立を最終目的とし研究に取り組んでいる。本研究はそれぞれ特異的に金属を集積する上記3樹種の重金属吸収メカニズムの解明と吸収能力強化を目指し、各樹種の地下部菌根菌・内生菌と地上部の内生菌の関係を見出す。また、樹木による特異的な元素蓄積における地下部菌根菌・内生菌-地上部内生菌ネットワークの存在と関与を明らかにすることを目的とし、樹木の金属集積特性と樹体に内生する糸状菌との関係性について理解を深めるための調査を行った。

3. 研究の方法

本研究は、金属集積樹種の重金属吸収メカニズムの解明と吸収能力強化を目指し、各樹種の地下部菌根菌・内生菌と地上部の内生菌の関係を見出すことを最終目標とし、以下のプロセスで進めた。樹木の各組織内の菌相について季節変化を調べ、樹木や組織の成長や金属集積過程との関係性を調べる。

- (1)各樹種の地下部・地上部内生菌の単離、同定および、各組織の金属分布・濃度と内生菌の分布・感染率を調べる。また、
- (2)単離した各菌の金属耐性能、金属キレート物質・成長促進物質産生能を評価し、金属集積に関与していると考えられる菌種を絞りこむ。
- (3)金属集積になんらかの関連性があると考えられた種や、組織に優占している種を共培養し、菌種間の相互作用や金属に対する感応の変化を調べる。
- (4)

4. 研究成果

タカノツメとリョウブそれぞれの葉から単離した内生糸状菌（以下内生菌）の金属耐性試験と、内生菌の金属添加培地における IAA（植物ホルモンの一種）生産能、キレート物質（シデロフォアと低分子有機酸）生産能を比較した。その結果、両樹種共通して *Colletotrichum* 属は金属耐性が高く、特に *C. gloeosporioides* は金属添加培地上でも IAA やキレート物質生産能が高いことが分かった。

タカノツメの葉内生糸状菌種相の季節変化について DGGE 解析を用いて調査した結果、土壌中の重金属濃度が高い地域に生育しているタカノツメ葉においては、特に目立って優占する種は確認できなかった。一方、土壌中の重金属濃度が低い地域に生育しているタカノツメ葉においては、*C. gloeosporioides* と *Phyllosticta capitalensis* が優占することが分かった。*C. gloeosporioides* は重金属に対する耐性が高く、宿主植物にとって有益となると考えられる IAA やキレート物質生産能も高いことから、タカノツメの金属集積に関与している可能性が考えられる。*P. capitalensis* は亜鉛やカドミウムに対しての耐性が低いにも関わらず、優占種であった。*C. gloeosporioides* と共存することが、亜鉛やカドミウム濃度の高い葉内環境でも生育することが可能にしていると考えられた。

また、タカノツメの根内生糸状菌相を調査した結果、全てのサンプリング地点で共通した種が検出された。Zn や Cd 濃度の高い地域でのみ多く見られる種、金属濃度が低い地域でのみ検出される種があることが分かった。いずれの種も葉内で見られた種とは異なることが分かつ

た。

リョウブにおいては、葉内内生糸状菌は葉の展開初期 5 月に優占していた種は 7 月には見られなくなり、11 月の落葉期には 7 月に優占していた種以外の種が多く検出された。7 月に優占していた種は *Colletotrichum* 属であった。葉内の金属濃度は特に Co と Mn の濃度が高かった。タカノツメの葉内で優占していた *C. gloeosporioides* のように *Colletotrichum* 属は比較的金属耐性が高い種が多い。これらのことから、リョウブの葉への金属集積と *Colletotrichum* 属はなんらかの関係性があると考えた。

また、根内内生糸状菌相は 5 月から 7 月にかけて共通した 4 種が優占していたが、落葉期の 11 月は夏期とは異なる 3 種が優占していた。

無菌条件下で生育させたリョウブ苗に、重金属耐性が高く、物質生産能を有する内生菌の摂取試験を行った。接種した菌のうち、*C. gloeosporioides* のみ感染確認ができたが、菌接種による幼苗の明瞭な生育促進および金属集積の増加は確認されなかった。

リョウブにおいてリョウブ根圏土壌抽出物を培地に添加する方法で根内内生菌の接種試験を行った。その結果、Ni を集積させたリョウブ幼苗において成長が増加する傾向が見られたが、幼苗体中の金属濃度に違いは見られず、K や P などの多量必須元素濃度が減少していた。これらの結果から、リョウブが体内に集積している金属が根内内生菌の種や機能に影響を与えていると考えられた。

これらのタカノツメ、リョウブの内生糸状菌の結果から、それぞれの種は特定の金属を集積させることにより、組織内に存在する内生菌相を制御している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Misuzu Sakurai, Rie Tomioka, Hokura Akiko, Yasuko Terata, Chisato Takenaka. Distribution of cadmium, zinc, and polyphenols in *Gambrea innovans*. *International Journal of Phytoremediation*, 14, 2019, 217-223. Doi: 10.1080/15226514.2018.1524840. 査読有
- 2) Tsuyoshi Ymaguchi, Chie Tsukada, Kentaro Takahama, Toshiki Hiroto, Rie Tomioka, Chisato Takenaka. Localization and speciation of cobalt and nickel in the leaves of the cobalt-hyperaccumulating tree *Clethra barbinervis*. *Trees*, 33, 2019, 521-532. doi: 10.1007/s00468-018-1797-6. 査読有
- 3) Tsuyoshi Ymaguchi, Rie Tomioka, Chisato Takenaka. Accumulation of cobalt and nickel in tissues of *Clethra barbinervis* in a metal dosing trial. *Plant and Soil*, 421, 2017, 273-283. Doi: 10.1007/s11104-017-3445-y. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 山口毅志, 富岡利恵, 竹中千里. 重金属集積植物リョウブのリタ 分解に伴う元素動態. 日本生態学会 2019 年.
- 2) 山口毅志, 塚田千恵, 富岡利恵, 竹中千里. 重金属集積樹木リョウブ葉における Co, Ni の局在と化学状態. 日本土壌肥料学会 2018 年.
- 3) 織邊尚子, 富岡利恵, 竹中千里. 重金属集積樹木タカノツメの内生菌相分析. 日本植物学会 2018 年.
- 4) 山口毅志, 富岡利恵, 竹中千里. 木本植物リョウブにおける重金属集積. メタルバイオサイエンス研究会 2018 年.
- 5) 織邊尚子, 岡野由季, 富岡利恵, 竹中千里. タカノツメ重金属集積特性と内生菌相との関係. 日本生態学会 2018 年.
- 6) 富岡利恵, 織邊尚子, 岡野由季, 山口毅志, 竹中千里. 重金属集積樹木における重金属集積特性とその意義. 日本森林学会 2018 年.
- 7) 織邊尚子, 岡野由季, 富岡利恵, 竹中千里. 重金属集積樹木タカノツメの葉内生糸状菌の関係性. 中部森林学会 2017 年.
- 8) 山口毅志, 竹中千里, 富岡利恵. 樹木リョウブの重金属輸送・蓄積における選択性. 日本土壌肥料学会 2017.
- 9) 岡野由季, 富岡利恵, 村瀬潤, 竹中千里. タカノツメ葉内生菌相と葉中金属濃度および有機酸濃度の関係. 日本生態学会 2017 年.
- 10) 山口毅志, 竹中千里, 富岡利恵. リョウブの Ni, Co 集積特性について. 日本生態学会 2017 年.
- 11) 福士彰久, 竹中千里, 富岡利恵, 松田陽介, 福山文子. コシアブラにおける元素吸収特性について、アーバスキュラー菌根菌に着目して. 日本森林学会 2017 年.

〔図書〕 特になし

〔産業財産権〕 特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹中 千里

ローマ字氏名：Chisato Takenaka

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院生命農学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40240808

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。