

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870275

研究課題名(和文) クロマツ林再生に向けたヘルパー細菌の利用 -菌根共生促進物質の解明-

研究課題名(英文) The use of mycorrhiza helper bacteria for recovering pine forest. -Resolution of the substances of mycorrhization enhancement-

## 研究代表者

片岡 良太 (KATAOKA, Ryota)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：00635104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、菌根共生を促進する細菌が生産する菌根共生促進物質を単離・同定し、機能解析することを目的としている。菌根共生促進物質を単離するために新たに人工合成培地を開発した。窒素源としてバリンを添加したところ菌根菌の生育促進活性が強く確認された。また、液体培地でヘルパー細菌を培養した培養上清から酢酸エチルを用いて物質の抽出を行ったところ、生育促進活性が認められた。一方で植物病原菌 *Fusarium oxysporum* の生育促進効果を有する根圏細菌の分離を試みたところ、*Arthrobacter* 属菌が *F. oxysporum* の生育を促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to purify and identify the mycorrhiza facilitation substances produced by mycorrhiza helper bacteria. Newly artificial medium was developed to purify its substance. Helper bacteria showed the enhancement of hyphal growth when valine put into the media as nitrogen source. In addition, crude substances were extracted from spent broth of helper bacteria using ethyl acetate, which showed effect of hyphal enhancement. On the other hand, newly bacteria having the hyphal enhancement activity on *Fusarium oxysporum* were isolated from rhizosphere soil. The sequencing analysis showed that the bacteria were *Arthrobacter* spp.

研究分野：土壌学および土壌微生物学

キーワード：菌根共生促進物質 クロマツ 微生物間相互作用 根圏細菌

1. 研究開始当初の背景

多くの樹木根は糸状菌である外生菌根菌 (ECM) と共生関係にあることが知られており、菌根菌が共生した植物根は「菌根」と呼ばれる。クロマツも菌根性樹種であり、その吸収根のほとんどは菌根化しており、その吸収根のほとんどは菌根化しており、土壌養分の吸収は事実上すべて ECM を介して行われている。そのため、クロマツの育成には育苗時の速やかな菌根共生成立が重要なカギとなる。菌根共生の成立には、宿主植物と菌根菌が互いを認識する必要がある。アーバスキュラー菌根菌 (AM) では菌糸の先端が細かく分岐する形態変化 (宿主認識反応) を示すことが知られている。この宿主認識反応を誘導する物質は長年にわたり未解明だったが、2005 年 Akiyama らは、AM の宿主認識反応に関わるシグナル物質を単離し、ストリゴラクトン類縁化合物であることを明らかにした (Akiyama *et al.*, 2005 Nature)。シグナル物質の同定は、AM 菌根共生研究の大きなブレークスルーとなったが、AM とは大きく異なり樹木と共生する ECM においては、シグナル物質についての研究例がないのが現状である。また、これまでの菌根研究は、植物-菌根菌の 2 者相互関係を研究してきたが、根圏に生息する細菌が菌根共生系に強く関与していることが明らかになった (Bowen & Theodorou, 1979 Soil Biol. Biochem.)。こうした菌糸生育や共生を促進する細菌群は「Mycorrhiza helper bacteria (ヘルパー細菌)」として提案され (Garbaye, 1994 New Phytol.)、その後の研究からも数種がヘルパー細菌として報告されている (Poole *et al.*, 2001 New Phytol.)。研究代表者もこれまでの研究からクロマツ根圏土壌からヘルパー細菌を特定し、本ヘルパー細菌を接種することで *Suillus granulatus* 株の菌根共生が有意に促進されることを見出した。

2. 研究の目的

ヘルパー細菌は、研究代表者が行った研究から培地上で外生菌根菌 (ECM) と接触することなく ECM の菌糸生育を促進するため、何らかの物質を生産していることが強く示唆される。そこで、ヘルパー細菌が生産するシグナル物質解明のために、その単離・同定・機能解析を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) これまでヘルパー細菌の培地として pH を 7.0 に調節したポテトデキストロース寒天培地 (PDA) を使用してきたが、目的物質の精製・単離を行うには、組成がより単純で生理活性物質の生産が高い培地でヘルパー細菌を培養することが望ましい。そこで、無機塩とグルコースを主体とした新たな合成培地の開発を行った。培地組成は、グルコースと硫酸マグネシウム、リン酸カ

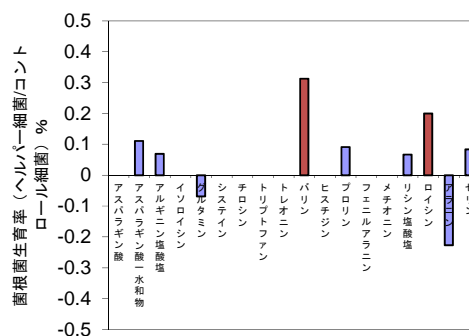
リウムを主成分とし、窒素源としてアミノ酸を加えた。アミノ酸はアスパラギン酸、アスパラギン酸一水和物、アルギニン塩酸塩、イソロイシン、グルタミン、システイン、チロシン、トリプトファン、トレオニン、バリン、ヒスチジン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、リシン塩酸塩、ロイシン、アラニン、セリンを用いた。また、培地 pH を 4、5、6、7、8、9 と変化させ pH の影響についても検討した。

(2) 上記で完成した組成の液体培地でヘルパー細菌を培養し、酢酸エチルを用いて粗抽出を行い、50% メタノール水溶液に再溶解させ粗抽出物とした。この粗抽出物について ECM に対する生育促進効果を検討した。また、ゲル濾過樹脂を用いたクロマトグラフィーにより粗抽出物を純化し、各画分における生物活性並びに HPLC および GCMS 分析を実施した。

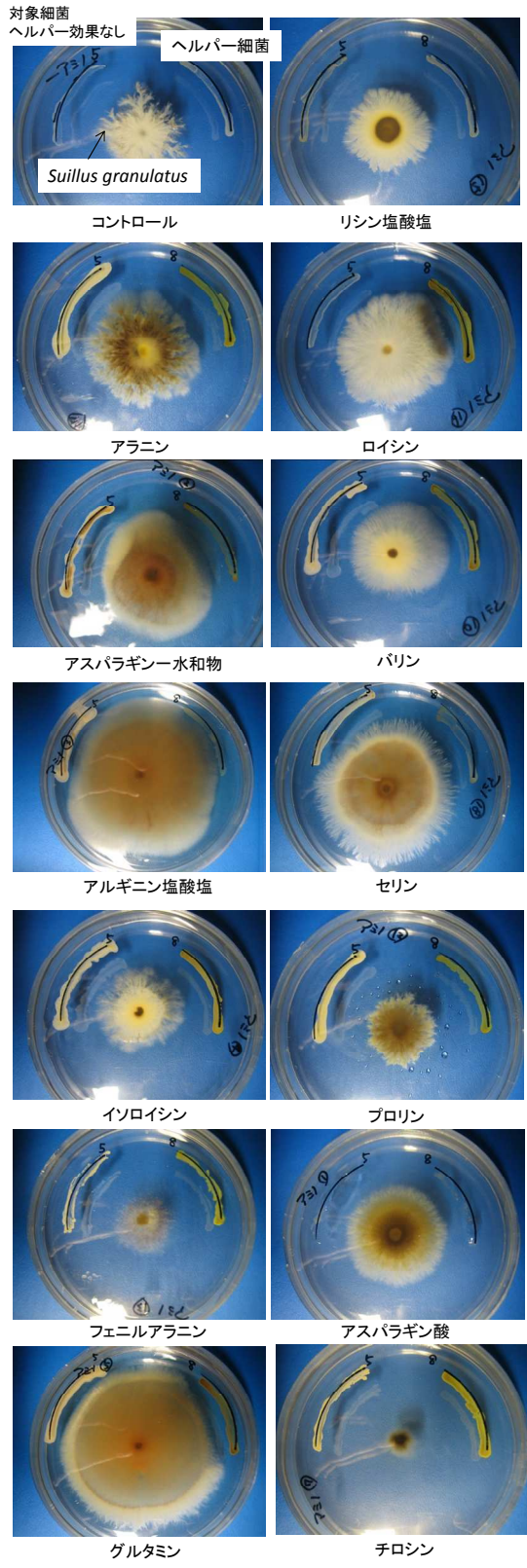
(3) ヘルパー細菌の研究を実施する中で対象微生物の生育スピードが ECM よりも早い土壌生息糸状菌に対する生育促進効果を有する細菌を分離した。これによりヘルパー細菌との比較が可能であることに加え、迅速なアッセイが可能となる。そこで、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* の菌糸伸長を促進する根圏細菌を分離し、促進効果の検討を実施した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸が生育促進効果に与える影響  
グルコース 5g/L、硫酸マグネシウム 0.5 g/L、ゲランガム 10 g/L の基本組成に 18 種のアミノ酸をそれぞれ 0.5 g/L となるように加えた。その結果、分岐鎖アミノ酸であるバリン、ロイシンで生育が促進されることを見出した。ただし、その促進活性はバリンで最も強く、側鎖に炭素が一つ入ったロイシンでは活性が低下し、イソロイシンでは見られなかった。一方で、アラニンやアスパラギン一水和物、グルタミンのように ECM の生育を抑制する効果が見られたことから栄養生理条件により ECM の生育を促進または抑制することが明らかになった (写真①、図①)。※システイン、トレオニン、メチオニンでは ECM が生育しなかった。



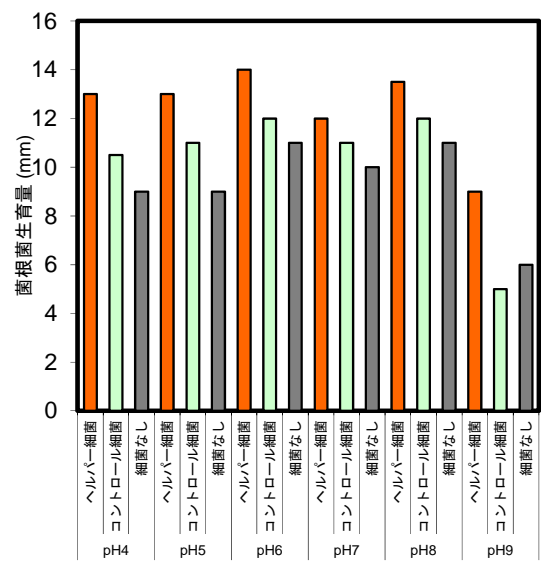
図① 各種アミノ酸によるヘルパー効果



写真① 各種アミノ酸がヘルパー細菌のヘルパー効果に与える影響

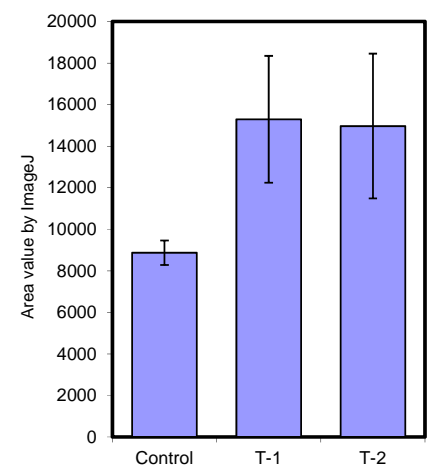
次に pH がヘルパー効果に与える影響について検討した。上記アミノ酸からバリン、ロイシン、イソロイシンを用いて pH4 から 9 まで 6 段階に設定し、再度培養を行った。その結果、イソロイシンではいずれの pH

においても生育促進効果は認められなかった。またロイシンについては、pH4 においてのみ生育促進効果が認められたが、その効果はごく小さいものだった。それに対して、バリンを添加した培地ではいずれの pH でも生育が促進された (図②)。特に pH4、pH5 といった酸性側で促進効果が顕著に見られることが明らかとなった。そのため、本実験からヘルパー細菌の生理活性物質を特定するための培地として、グルコース 5g/L、硫酸マグネシウム 0.5g/L、ゲランガム 10g/L、バリン 0.5 g/L、pH5 を用いることとした。



図② バリン添加時の培養初期 pH がヘルパー効果に与える影響

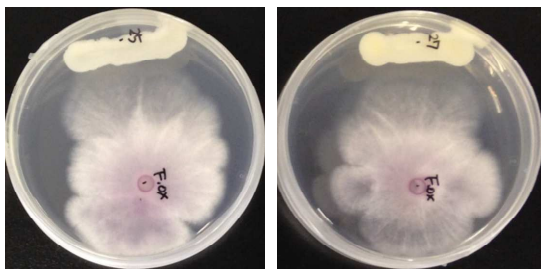
(2) 上記組成の液体培地 (ゲランガムは除く) を作製し、ヘルパー細菌を 3 日間培養した培養上清から酢酸エチルを用いて抽出を行ったところ、粗抽出物に生育促進活性が認められた (図③)。



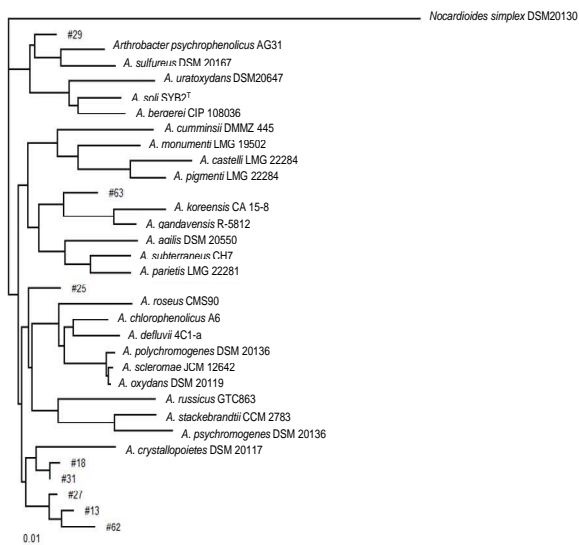
図③ 粗抽出物が ECM の生育に与える影響  
コントロール; 50%メタノール添加、T-1; 培養上清を pH2 にしてから抽出、T-2; pH10 にしてから抽出 (n=5, Error bar means SD)

ヘルパー細菌を培養した培養上清を酢酸エチルで抽出した粗抽出物に生育促進活性を見出した。HPLC 分析に供したところ保持時間 5 分付近でコントロールでは見られないピークが確認された。しかしながら、GCMS 分析ではコントロールと異なるピークを見出すことが出来ておらず、HPLC/MSMS などを用いて引き続き物質の特定を行うこととした。

(3) ナスに病徴を示す *Fusarium oxysporum* の生育を促進する根圏細菌のスクリーニングを実施したところ、ナス根圏から分離した細菌 70 株中 49 株では菌糸の生育に大きな変化は見られず、10 株では菌糸を抑制する拮抗作用を示した。しかし、11 株で菌糸の生育を促進する現象が確認された(図④)。シークエンス解析の結果から *F. oxysporum* の生育を促進した細菌は *Arthrobacter* spp. (8 株/11 株中)が最も多く確認され、次いで *Cupriavidus* sp., *Lysinibacillus* sp. 株でも確認された (図⑤)。本研究で分離され生育促進活性が確認された *Arthrobacter* spp. は 5 株が近縁に位置しているが、残りの菌株については系統的に離れており、*Arthrobacter* 属菌に広く有する機能である可能性がある (図⑤)。また、本研究で分離した *Arthrobacter* 属菌株がいずれも細胞外多糖を多く分泌していることが特徴として挙げられる。



図④ *F. oxysporum* の生育を促進する細菌



図⑤ *Arthrobacter* 属菌の系統樹

以上の結果から、ヘルパー細菌の ECM に対するヘルパー効果を維持した単純合成培地を検討し、グルコース、硫酸マグネシウム、リン酸カリウム、バリンを含む培地を開発した。また、液体培地で培養した培養上清を酢酸エチルで抽出した粗抽出物においても ECM 菌糸伸長を促進したことから、本ヘルパー細菌は何らかのヘルパー物質を体外に分泌していることが明確となった。しかしながら、主目的である物質の特定には至っておらず、今後更なる解明が必要である。また、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* の菌糸伸長を促進する細菌が存在することが確認された。分離した細菌の多くが *Arthrobacter* 属菌であった。土壌中で起こる微生物間相互作用として植物病害の誘発に対して、こうした細菌が関与している可能性も考えられる。今後、更なる解明が必要である。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①片岡 良太, フザリウム属菌に対する生育促進因子, 土壤肥料学会関東支部大会, 2014 年 12 月 6 日, 山梨大学 (山梨県甲府市)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 良太 (KATAOKA, Ryota)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 00635104

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: