

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580064
 研究課題名（和文） 菌根菌の外生菌糸の浸出物に含まれる酸性ホスファターゼによる有機態リン酸の利用
 研究課題名（英文） Utilization of organic phosphate by acid phosphatase released from external hyphae of mycorrhizal fungi
 研究代表者
 俵谷 圭太郎（TAWARAYA KEITARO）
 山形大学・農学部・教授
 研究者番号：70179919

研究成果の概要：

各種土壌からアーバスキュラー菌根菌を単離し、コンパートメントポット培養により菌糸の浸出物を含む土壌溶液を回収し、酸性ホスファターゼ活性を測定したところ、泥炭土壌から単離した *Glomus clarum* が高い酸性ホスファターゼ活性を示した。この酸性ホスファターゼ活性はフッ化ナトリウム及びモリブデン酸ナトリウムにより阻害された。SDS-PAGE により菌糸の浸出物中の酸性ホスファターゼは菌特異的であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌、リン酸、菌糸の浸出物

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根菌による宿主植物のリン酸吸収の促進は、第一に土壌中に伸張した外生菌糸による吸収表面積の増大によるものと説明されている。外生菌糸が吸収するリンの形態は H_2PO_4^- と HPO_4^{2-} である。一方、土壌中の全リン酸の 30-65%は有機態リン酸で占められ、高いものでは 90%に達する (Condrón et al. 2005)。菌根形成した植物が生育した後の土壌を分析すると、有機態リ

ン酸画分のリン濃度の低下がみられることがしばしば報告されている (Tarafdar and Marschner 1994)。これは菌根菌による有機態リン酸の可給化を示唆するものである。ある種の外生菌根菌は菌体からホスファターゼを土壌中に放出し、有機態リン酸を可給化することが報告されている (Jayakumar and Tan 2005)。アーバスキュラー菌根菌に関しては根の浸出物と菌糸の浸出物を区別して

採取することが出来なかったため、菌糸からホスファターゼなどが浸出されているかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

リン酸質肥料の原料であるリン鉱石の枯渇が予想され、また農耕地に施用・蓄積した有機態リン酸は作物には直接利用されにくいことから、作物による土壌からのリン酸獲得能の向上が必要とされている。本研究では、陸上植物の7割と共生関係を形成しているアーバスキュラー菌根菌が土壌中に放出する酸性ホスファターゼを利用した有機態リン酸の利用効率の向上を目指す。具体的には

- (1) 高ホスファターゼ分泌菌のスクリーニング、
- (2) コンパートメント土耕培養を用いた高ホスファターゼ分泌菌の培養による酸性ホスファターゼの精製と性質解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 高ホスファターゼ分泌菌のスクリーニング

国内外の各種土壌からアーバスキュラー菌根(AM)菌をトラップ培養により分離した。ナイロンネット(30 μm)で根区画と菌糸区画に分けたポットに滅菌黒ボク土を詰め、セラミック製の土壌溶液採取管(直径2mm、長さ50mm)を埋め込んだ。AM菌(*Glomus clarum*)の接種区と非接種区を設け、タマネギ(*Allium cepa*)を成育させた。菌糸コンパートメント及び根コンパートメントから土壌溶液を回収し、*p*-ニトロフェニルリン酸と反応させ、生成した*p*-ニトロフェノール量よりホスフォモノエステラーゼ活性を測定し、得られた活性から高ホスファターゼ分泌菌を選抜した。

(2) 高ホスファターゼ分泌菌の土耕培養による酸性ホスファターゼの精製と性質解明

ナイロンネット(30 μm)で根区画と菌糸区画に分けたポットに滅菌黒ボク土を詰め、セラミック製の土壌溶液採取管(直径2mm、長さ50mm)を埋め込んだ。AM菌(*Glomus clarum*)の接種区と非接種区を設け、タマネギを成育させた。播種後39から63日目まで土壌溶液を採取した。これらの溶液中の酸性ホスファターゼ活性、菌根形成率、リン含有率、地上部乾物重と外生菌糸長を測定した。さらに各処理区の土壌溶液を濃縮し、SDS-PAGE後、酸性ホスファターゼの活性染色を行なった。

4. 研究成果

Glomus clarum, *Glomus versiforme*, *Gigaspora margarita*が単離された。接種区の根に菌根が形成され、両コンパートメントのムライトセラミック管に外生菌糸の付着が観察された(図1)。また根コンパートメントから菌糸コンパートメントへの土壌溶液の移動は5mm以下であった。菌根形成によりタマネギのリン酸吸収と地上部の成育が促進された。アーバスキュラー菌根菌接種区の根コンパートメントおよび菌糸コンパートメントの土壌溶液のホスファターゼ活性は非接種区より高かった(図2)。*G. clarum*は泥炭土壌から、*G. versiforme*は褐色低地土から、*G. margarita*は黒ボク土から単離された。これらのことから有機物含量が高い土壌に生息するアーバスキュラー菌根菌は、高ホスファターゼ分泌能を有する可能性が示された。

AM菌の接種により、タマネギは80%以上の菌根形成率を示した。菌根形成により、リン酸吸収と地上部の成育が促進された。接種区の両区画の採取管の表面に外生菌糸の付着

が確認できた。接種区の外生菌糸長は非接種区より長かった。酸性ホスファターゼの全活性は、*G. clarum* 接種区のいずれの区画でも播種後 39 日目に最も高く、その後低下した (図 3)。

G. clarum の外生菌糸の浸出物中の酸性ホスファターゼ活性は 1 mM フッ化ナトリウム及び 1 mM モリブデン酸ナトリウムにより阻害された (図 4)。

PAGE 後の活性染色では *G. clarum* 接種区の菌糸区画土壌溶液から菌根特異的なバンドが検出された (図 5)。加圧式フィルターユニット及び遠心式フィルターユニットのどちらを用いた濃縮方法によっても濃縮することができた。

これらのことから AM 菌の菌糸は酸性ホスファターゼを分泌して有機態リンを可給化し、またそれは菌体由来のもと考えられた。



図 1 セラミック製土壌溶液採取管の表面に付着した *Glomus clarum* の外生菌糸

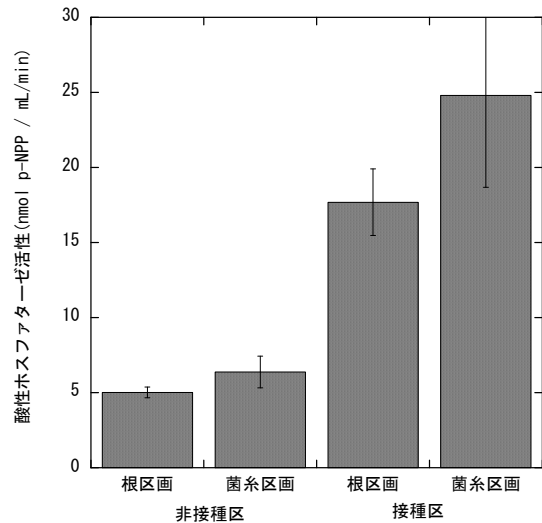


図 2 非接種区及び *Glomus clarum* 接種区の根区画及び菌糸区画の土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性

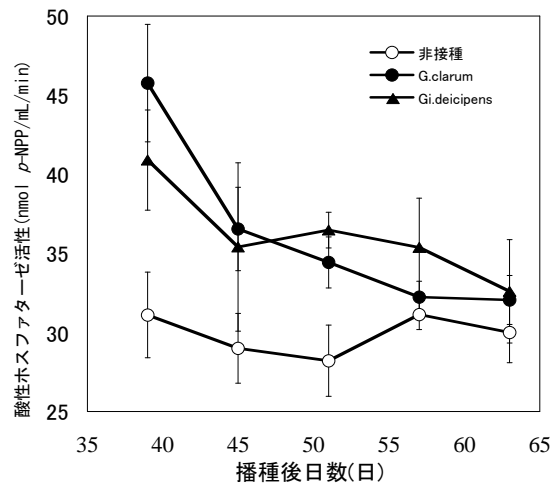


図 3 非接種区及び *Glomus clarum* 接種区の菌糸区画の土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の経時変化

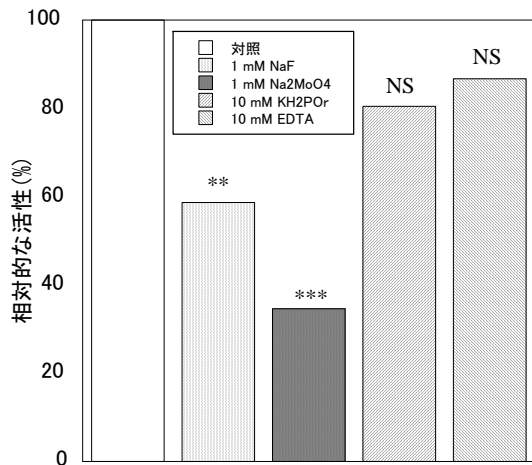


図4 *Glomus clarum*の外生菌糸の浸出物中の酸性ホスファターゼ活性に対する阻害剤の影響

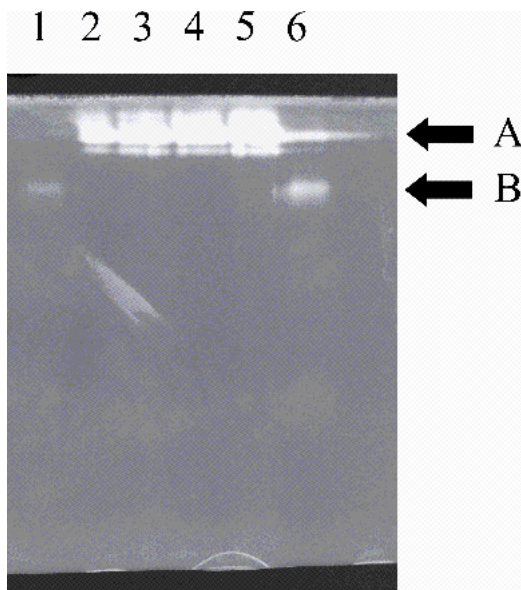


図5 タマネギの根の抽出物及び *Glomus clarum*の外生菌糸の浸出物中の酸性ホスファターゼ活性 1、6：菌根形成していないタマネギの根の抽出物、2、4加圧式ウルトラフィルターユニットにより濃縮した菌糸の浸出物、3、5遠心式フィルターユニットにより濃縮した菌糸の浸出物 A菌糸の浸出

物中の酸性ホスファターゼ、B根の抽出物中の酸性ホスファターゼ

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4件)

- ① Turjaman M, Tamai Y, Sitepu IR, Santoso E, Osaki M and Tawaraya K : Improvement of early growth of two tropical peat-swamp forest tree species *Ploiarium alternifolium* and *Calophyllum hosei* by two arbuscular mycorrhizal fungi under greenhouse conditions. *New Forests* **36**, 1-12. 2008 査読有
- ② Tawaraya K, TurJaman M and Ekamawanti HA : Effect of arbuscular mycorrhizal colonization on nitrogen and phosphorus uptake and growth of *Aloe vera* l. *Hortscience* **42**, 1737-1739. 2007 査読有
- ③ Tawaraya K, Watanabe S, Vierheilig H and Wagatsuma T : Formation of appressoria by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* on roots of *Allium cepa* is linked with root age. *Mycoscience* **48**, 305-308. 2007 査読有
- ④ Deguchi S, Shimazaki Y, Uozumi S, Tawaraya K, Kawamoto H and Tanaka O : White clover living mulch increases the yield of silage corn via arbuscular mycorrhizal fungus colonization. *Plant Soil* **291**, 291-299. 2007 査読有

〔学会発表〕（計2件）

- ① 廣瀬僚太、我妻忠雄、俵谷圭太郎 圃場におけるネギ生育に対するアーバスキュラー菌根菌の影響 日本土壤肥料学会、2008年9月9日、名古屋
- ② 廣瀬僚太、元鍾大、我妻忠雄、俵谷圭太郎 アーバスキュラー菌根菌を利用したネギ品種におけるリン酸施肥削減 日本土壤肥料学会 2007年8月22日、東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俵谷 圭太郎 (TAWARAYA KEITARO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70179919

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし