

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21315

研究課題名(和文)植物界の「シーラカンス」は超ストレス環境下でどのように生き延びてきたか？

研究課題名(英文)How does "Coelacanth" in plant kingdom cope under hyper-stress environments?

研究代表者

和崎 淳(WASAKI, JUN)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：00374728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：硫気荒原とよばれる硫酸酸性土壌は、低いpHに加え、溶出するアルミニウムの毒性、必須元素の欠乏、硫化水素による呼吸阻害など、植物にとって強烈な超ストレス環境である。硫気荒原に純群落を形成するミズスギの示す特異な超ストレス耐性の解明に取り組んだ。ミズスギの超ストレス耐性は、高い低pH耐性とアルミニウム耐性によってもたらされていることが示唆された。また、そのアルミニウム耐性は有機酸による解毒よりは体内において隔離すること、あるいは有効利用することにより得ていることを示唆する結果が得られた。微生物による耐性への寄与はあまり明確ではなかったが、硫気荒原に特徴的な微生物群集を形成していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の成果は、これまでモデル植物で理解されてきたストレス耐性の常識を超えた小葉類ミズスギを材料とすることで、未知であった耐性機構を切り崩す端緒となるものである。特にアルミニウム耐性は種子植物においては分泌する有機酸によって解毒したり、有機酸と結合した形態で体内に蓄積したりする仕組みが知られてきたが、これとは異なる形での耐性であると理解される。今後、超ストレス耐性に重要な遺伝子を探索する上で極めて重要な遺伝資源であることが裏付けられ、ストレス耐性研究の新たなモデルとして位置付けられることも期待される。将来的にはこうした耐性の仕組みの活用により、持続的な作物生産につながることも期待される。

研究成果の概要(英文)：“Solfataria field” located around volcanic vents is a typical acid sulfate soil, which is the severe environment for plants by the hyper-stresses, such as very low pH, Al toxicity, starvation of essential elements, and inhibition of respiration by hydrogen sulfide. The aim of this study is to investigate the unique tolerant strategies of a Lycophytes, *Lycopodium cernuum*, which makes pure plant community in solfataria fields. It was indicated that specific tolerances to low-pH and aluminum of *L. cernuum* were important to grow under the hyper-stressed environments. It is suggested that isolation of free Al ion in vacuole is one of strategies of Al tolerance. Our results also implies that *L. cernuum* may utilize Al in intact plants. It was suggested that microbial community structure in the rhizosphere of *L. cernuum* was distinctive in solfataria fields, although involvement of the endophytes in the tolerance of *L. cernuum* is still unclear.

研究分野：植物栄養学・土壌微生物学

キーワード：ミズスギ 硫気荒原 ヒカゲノカズラ科 強酸性土壌 アルミニウム 養分吸収

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

火山国である我が国には硫黄分とよばれる硫黄分に富んだガスが噴出して硫酸により pH 2 台にも達する強酸性土壌が存在する。植物に対して硫黄分が示すストレスは、単に pH が低いことだけでなく、アルミニウムイオンの毒性やリンおよび必須金属元素の欠乏、硫化水素による呼吸阻害など、多岐にわたる。硫黄分に自生する植物はこれらの強烈かつ多重なストレスに対する耐性を有していると考えられることから、その耐性機構を理解することで、酸性土壌における作物生産や植生回復に活用することが期待される。

申請者らは、ヒカゲノカズラ科のミズスギ (*Lycopodium cernuum* L., 図 1) が硫黄分に純群落を形成していることを見出した。ヒカゲノカズラ科はシーラカンズと同様にデボン紀に分化した起源の古い生物で、系統的にはシダ類とコケ類の中間に位置する維管束植物である。そのため、種子植物に基づく従来の常識とは大きく異なるストレス耐性機構を有している可能性がある。事実、これまでの調査において、土壌 pH の低い硫黄分に生育するミズスギは



図 1 硫黄分において採取されたミズスギ。

通常環境下で生育する個体と比べてリンやカリウムを多く吸収するとともに、環境に関係なくアルミニウムを高濃度に蓄積していることが示された。さらに、ヒカゲノカズラ科は一般的に菌根菌との共生に依存するとされるが、本種においては調査した限りにおいて菌根菌の共生が認められない一方で、硫黄分に生育するミズスギ特異的に特徴的な真菌 (*Cladophialophora* 属に最近縁) が根毛内に内生し、何らかの役割を果たしている可能性が見出された。以上のように、従来のモデル植物等で理解されてきた仕組みとは異なるストレス耐性機構を有することを示唆する結果が得られている。

### 2. 研究の目的

本研究は、硫黄分に純群落を形成するミズスギを対象として、この環境下での超ストレス耐性機構の解明に取り組む。ミズスギが生育する九州地域を中心に現地調査を行って生態学調査と元素分析を行う一方で、栽培試験をベースとした生理解析と mRNA の網羅解析を行い、ミズスギが有する特異的な超ストレス耐性とその分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

現地調査と栽培試験を行い、低 pH 耐性、アルミニウム耐性、元素の吸収特性、呼吸阻害耐性、微生物との共生の面から硫黄分に生育するミズスギの超ストレス耐性を調査した。

#### (1) 植物自身によるストレス耐性の調査

ミズスギは孢子で繁殖するほか、匍匐枝によるクローン繁殖も見られる。孢子による繁殖後に栽培する方法は困難であると考えられたため、2020 年度に匍匐枝から株分けした個体を用いた

水耕栽培方法の確立を行った。

確立した水耕栽培法に基づき、硫酸による低 pH ストレス及び  $\text{AlCl}_3$  を与えることにより Al ストレスを与えて栽培を行い、生育と元素吸収動態についての調査を行った。また、処理を行った個体の根にピロカテコールバイオレット染色を行い、Al の分布について調査を行った。さらに、栽培後の植物体から RNA を抽出し、RNA-seq による解析を実施した。

## (2) 生態調査とイオノーム解析

九州地方の硫気荒原および非硫気荒原においてミズスギの分布を調査した。調査地としては大分県(別府～由布地域、九重地域)、鹿児島県(霧島地域)を候補としたが、新型コロナウイルス感染症の拡大により現地調査を行う機会にかなり制約があったこと、集中豪雨によって一部の調査地に入れなくなったことから、当初計画より調査は限られる形となった。調査地においては植物体を採取し、乾燥させた植物体に対して ICP-MS を用いた多元素一斉分析を行った。得られた元素分析のデータは主成分分析によりプロファイル全体の比較解析も行った。この項目については、2020 年度に霧島地域を中心に、2021 年度に別府～由布地域にかけての現地調査を行った。

## (3) 微生物共生によるストレス耐性

2020 年度に霧島地域において採取した個体を用いて、ITS 領域を対象としたアンプリコンシーケンスを行い、硫気荒原特異的に共生する真菌の群集構造解析を実施した。また、硫気荒原のミズスギ根に共生する真菌類の単離・培養を試みた。

# 4. 研究成果

## (1) 植物自身によるストレス耐性の調査

水耕栽培によりミズスギの低 pH、Al 耐性を評価したところ、pH は 3.5 以上、Al は 0.1 mM まで比較的良好に生育した。Al 処理条件下で栽培したミズスギの地上部と根分泌物を対象にクエン酸およびリンゴ酸の測定を行ったところ、葉の有機酸濃度は、リンゴ酸は対照区と Al を添加した場合で有意な違いは見られなかったが、クエン酸は対照区より Al を添加した場合に有意に濃度が減少した。分泌液の有機酸においては、リンゴ酸・クエン酸共に Al に誘導されて分泌する傾向が見られた(図 2)。Al 添加時は、リンゴ酸がクエン酸の約 2 倍多く分泌されていた。これらのことから、ミズスギは Al に誘導されて有機酸を分泌するが、その際に地上部に貯蔵した有機酸を利用している可能性が考えられる。ただし、これまでに知られている植物の有機酸分泌速度と比較すると、アルミニウムストレス条件でのコムギ根によるリンゴ酸分泌( $0.34 \text{ nmol g}^{-1}\text{FW s}^{-1}$ )やリン欠乏条件でのシロバナルーピン根によるクエン酸分泌( $0.16 \text{ nmol g}^{-1}\text{FW s}^{-1}$ )と比較してかなり低いレベルであることが示された。局所的にはこれらの有機酸は耐性に寄与している可能性は考えられるが、主要なアルミニウム耐性機構ではない可能性も考えられた。

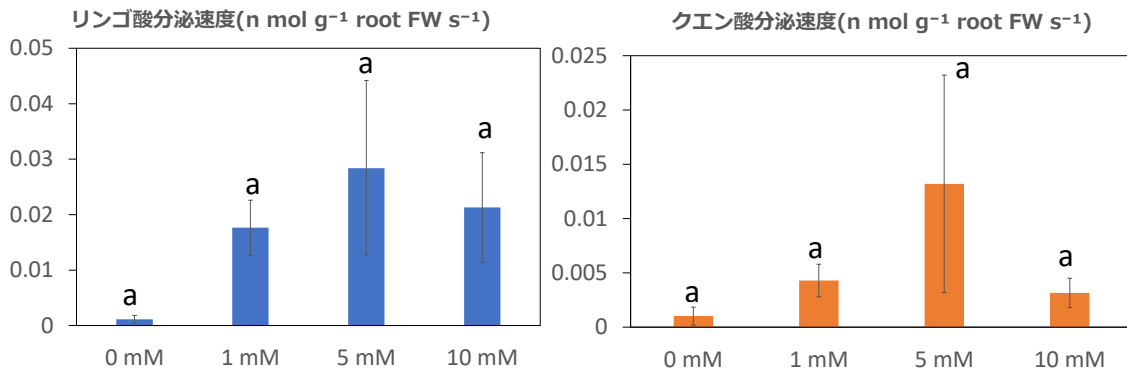


図2 アルミニウム処理を行って水耕栽培したミズスギのリンゴ酸およびクエン酸分泌速度。

ピロカテコールバイオレットにより Al 処理した根における Al の分布を調査した結果、Al は根の表面、特に根毛に多く分布している様子が観察された。根毛が少ない領域においては表皮細胞の染色が顕著であった。以上の結果から、ミズスギの根圏においては可溶性の Al が主に根の表面に分布しており、細胞壁構造に取り込んでいる可能性が考えられた。

上記の栽培に用いた植物体から RNA を抽出し、150 bp のペアエンドで RNA-seq を実施した。得られた配列データをもとに解析を進め、比較解析に十分用いることができるクオリティのコンティング情報を得ることができ、Al ストレスによって発現が誘導される遺伝子群があることが示された。詳細な解析は現在も継続して行っている。

## (2) 生態調査とイオノーム解析

ミズスギ生育地点の根圏土壌と非根圏土壌の間で pH を比較すると、硫気荒原におけるミズスギ根圏土壌の pH は 3.65~4.03 であり、非根圏土壌では 3.13~3.37 であった。ミズスギ根圏において非根圏土壌より pH が高く、ミズスギは必ずしも極端に pH が低いことを好んでいるわけではないことが示唆された。

硫気荒原および非硫気荒原において、ミズスギおよびこれと共存する植物について葉身のイオンプロファイル进行调查したところ、ミズスギではアルミニウム濃度が多く他の植物よりも高く、硫気荒原では 5.58

~9.94 mg-Al gDW<sup>-1</sup> と高い濃度で集積していた。この濃度は既知の Al 集積型植物であるハイノキ科植物 (クロキ) について高かった。非硫気荒原に見られたミズスギはこれよりは低い水準であったが、同じ地点で採取された同じ小葉類のヒメクラマゴケの 5 倍程度であった。このことからミズスギは高い濃度で Al を吸収する「Al 集積植物」であると考えられた。硫気荒原で採取されたミズスギ植物体においては非硫気荒原で採取された個体より P, K, Mg 濃度が高く、Ca 濃度が低い特徴が見られた。分析したイオンプロファイルを用いて主成分分析を行ったところ、硫気

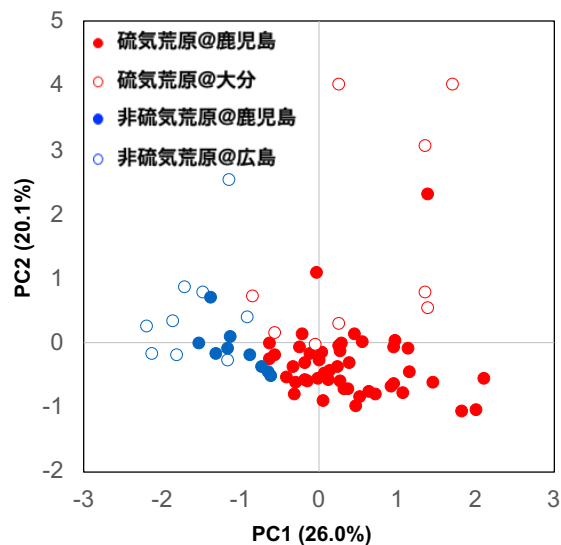


図3 硫気荒原と非硫気荒原で採取したミズスギのイオンプロファイルをもとに行った PCA 解析の結果。

荒原と非硫気荒原で大きく異なるイオン組成になることが示された (図3)。

霧島地域の調査地において近傍に自生していたミズスギとコシダの生育地点における土壌特性を比較したところ、ミズスギ生育地点においてコシダ生育地点より土壌 pH が低かった。上限の土壌水溶性 Al 濃度はミズスギで高く、より高濃度の可溶性 Al を含む土壌に適応できることが示唆された。土壌で栽培したミズスギ地上部から直接  $^{27}\text{Al}$  NMR スペクトルを得た結果、Al は無機モノマー態イオンとしておそらく液胞に隔離されていると考えられた。

### (3) 微生物共生によるストレス耐性

ミズスギの根圏土壌微生物群集を調査したところ、未知の真菌が多くを占めるなど特徴的な群集構造であることが示された。アーバスキュラー菌根菌のグループである Glomeromycota は硫気荒原、非硫気荒原のどちらで採取したミズスギでも 0.9%以下と極めて低く、特に硫気荒原で採取した個体においては 0.1%以下であった。なお、非硫気荒原においてミズスギの近傍で採取した小葉類のヒメクラマゴケにおいて Glomeromycota の検出割合は高いもので 22%であり、同じ土壌に存在することが示されている。以上のことから、ミズスギは菌根菌との共生にはほとんど依存していないものと推定された。

ミズスギ根圏における真菌のうち、最も高い割合を占めたのは Ascomycota であり、最も高い割合を占めた個体では 89%に達した。このうち、*Cladophialophora* 属は最も高い割合を占めるわけではなかったが、全体の 18%を占める個体もあった。ただし、種までは特定できるものはなく、未同定の種がほとんどであった。*Cladophialophora* 属の真菌を含め、培養を試みたが、現時点で耐酸性に寄与することが示唆される菌株の特定には至っていない。

### (4) まとめと今後の展望

本研究の推進により、ミズスギの超ストレス耐性は、高い pH 耐性とアルミニウム耐性によってもたらされていることが示唆された。また、そのアルミニウム耐性は有機酸による解毒よりは体内において隔離すること、あるいは有効利用することにより得ていることを示唆する結果が得られた。微生物による耐性への寄与についてはあまり明確ではなかったが、特徴的な微生物群集を形成していることから、特異的に見られる真菌が未知の共生機能により耐性に寄与している可能性については引き続き解析を行う必要があると考えられる。

RNA-seq 解析や微生物の解析は今後の展開によりさらなる成果をもたらす可能性がある。さらに、小葉類の特異的なストレス耐性は乾燥耐性にも見られる (イワヒバ科)。近年の次世代シーケンサーの利用技術の発展と解析コストが抑制されてきた現状から、ゲノム解析を行うことも現実的になってきた。以上の背景から、本研究課題において得られた研究成果を基盤として、発展的な研究課題として小葉類植物群の持つゲノムワイドな超ストレス耐性の調査に着手したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takao Atsuhide, Wasaki Jun, Fujimoto Hisae, Maruyama Hayato, Shinano Takuro, Watanabe Toshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible solubilization of various mineral elements in the rhizosphere of <i>Lupinus albus</i> L.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2021.1980355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Agrahari Raj Kishan, Enomoto Takuo, Ito Hiroki, Nakano Yuki, Yanase Emiko, Watanabe Toshihiro, Sadhukhan Ayan, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Panda Sanjib Kumar, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression GWAS of PGIP1 Identifies STOP1-Dependent and STOP1-Independent Regulation of PGIP1 in Aluminum Stress Signaling in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 774687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.774687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chengming Zhang, Tanaka Nobuhiro, Dwiyantri Maria Stefanie, Shenton Matthew, Maruyama Hayato, Shinano Takuro, Qingnan Chu, Jun Xie, Watanabe Toshihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Ionomic Profiling of Rice Genotypes and Identification of Varieties with Elemental Covariation Effects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rice Science	6. 最初と最後の頁 76~88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rsci.2021.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Enomoto Takuo, Yoshida Junko, Mizuno Takafumi, Watanabe Toshihiro, Nishida Sho	4. 巻 16
2. 論文標題 Differences in mineral accumulation and gene expression profiles between two metal hyperaccumulators, <i>Noccaea japonica</i> and <i>Noccaea caerulea</i> ecotype Ganges, under excess nickel condition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1945212~1945212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2021.1945212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本 晃弘、和崎 淳、船津 勇一、大崎 壮巳、中坪 孝之	4. 巻 -
2. 論文標題 九州地方の硫気荒原における外来草本メリケンカルカヤAndropogon virginicus L.の侵入	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 保全生態学研究	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18960/hozen.2117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshihiro Watanabe
2. 発表標題 Basic understanding of aluminum accumulator plants.
3. 学会等名 Joint Symposium Lithuania - Japan: Biodiversity Conservation and Natural Resources Management based on a Biotechnological approach to Plant-Microbe interaction under a Changing Environment (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和崎 淳、山本 晃弘、丸山 隼人、中坪 孝之、渡部 敏裕
2. 発表標題 火山性強酸性土壌に生育する植物の葉身元素組成の特徴
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野隆文・河西皓仁・近藤大地・渡部敏裕・橋本 篤
2. 発表標題 ハンドヘルド型蛍光X線分析計を用いた野生植物の元素集積解析(2)石灰岩土壌植物の元素集積特性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤大地・河西皓仁・渡部敏裕・橋本 篤・水野隆文
2. 発表標題 ハンドヘルド型蛍光X線分析計を用いた野生植物の元素集積解析(3)野生植物の硫黄(S)含有量に関する調査・解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 才迫 明日香、渡部 敏裕、中坪 孝之、和崎 淳
2. 発表標題 硫酸酸性土壌に生育するミズスギのAl耐性機構
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第6回研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口 文香、吉井 健祐、丸山 隼人、佐々木 孝行、西田 翔、和崎 淳、信濃 卓郎、渡部 敏裕
2. 発表標題 アルミニウム集積植物 <i>Melastoma marabathricum</i> におけるMATE遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 久貴、丸山 隼人、和崎 淳、信濃 卓郎、渡部 敏裕
2. 発表標題 火山性強酸性土壌に生息するツクシテンツキの土壌および植物体のイオノミクス解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中坪 孝之 (NAKATSUBO TAKAYUKI) (10198137)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授  (15401)	
研究分担者	渡部 敏裕 (WATANABE TOSHIHIRO) (60360939)	北海道大学・農学研究院・准教授  (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------