

令和元年6月9日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07332

研究課題名(和文)アーバスキュラー菌根菌による有機態リン酸の獲得機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of acquisition of organic phosphate by arbuscular 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

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)：アーバスキュラー菌根(AM)菌の外生菌糸も酸性ホスファターゼ(ACP)を持つことが示唆されているが、浸出については不明であった。菌根区画と菌糸区画に分けられたポットにAM菌Rhizophagus clarusを接種区と非接種区を設け土壌溶液を回収した。活性染色により187 kDaのACP活性が接種区の土壌溶液から検出された。アマ毛状根にR. clarusを接種し、2段階のリン濃度で生育させた。外生菌糸表面および培地中のACP活性は低リン区で高リン区より高かった。これらの結果からAM菌R. clarusの外生菌糸は土壌中にACPを浸出し、その浸出は低リン条件下で促進されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸資源枯渇へ対応するためには農耕地における有機態リン酸を利用する必要がある。土壌中の外生菌糸から酸性ホスファターゼを浸出するアーバスキュラー菌根菌を作物に接種して利用することができれば、農耕地における有機態リン酸の利用が向上し、リン酸資源を国内で持続的に循環させることができる。

研究成果の概要(英文)：Extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi have acid phosphatase but its exudation is unknown. Soil solution was collected from hyphal compartment inoculated with AM fungus Rhizophagus clarus. ACP activity of 187 kDa was detected from soil solution of inoculated plant. Acid phosphatase activity in hyphal compartment of Linum usitatissimum was higher at low P level than that at high P level. These results suggest that AM fungi R. clarus exudes ACP and its exudation increased under P deficient condition.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：有機態リン酸 アーバスキュラー菌根菌 酸性ホスファターゼ

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

1. 研究開始当初の背景

今後100年以内にリン酸質肥料の原料であるリン鉱石が枯渇すると試算されており、また農耕地に蓄積した不可給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不可給態リン酸の獲得能の向上が必要とされている。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)。アーバスキュラー菌根(AM)形成した植物が生育した跡の土壌を分析すると、生育前と比べて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AM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酸性ホスファターゼを土壌中に浸出し、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)。AM菌に関しては根の浸出物と外生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、外生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。研究代表者はこれまでの研究によりナイロンバックと微小セラミックチューブを用いたコンパートメントポット栽培により外生菌糸の浸出物を含む土壌溶液を回収する方法を確立した(Tawaraya et al. 2006)。また、得られた菌糸の浸出物に酸性ホスファターゼ活性があることを明らかにした。さらに予備実験では、無菌条件のAM菌の研究で広く用いられてきた毛状根を2分割ペトリ皿で培養するコンパートメント毛状根培養により外生菌糸の浸出物を無菌的に回収することができた。そこで研究代表者は2つのコンパートメント培養方法を用いることによりAM菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼによる有機態リン酸の獲得機構を明らかにできるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、陸上植物の8割と共生関係を形成しているAM菌の外生菌糸が土壌中に浸出する酸性ホスファターゼを利用した有機態リン酸の獲得能の向上を目指して、(1)アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の浸出物からの酸性ホスファターゼの浸出及び(2)外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件下における応答の解明を目的とした。

3. 研究の方法

3-1 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の浸出物からの酸性ホスファターゼの浸出

口径30 µmのナイロンバックによって菌根区画と菌糸区画に分けられたポットに滅菌黒ボク土をそれぞれ加えた。ネギ(*Allium fistulosum*)の種子にAM菌 *Rhizophagus clarus* CK001を接種した区と非接種の区を設けた。ムライトセラミックチューブをそれぞれの区画の土壌に埋設し、土壌溶液を回収した。*R. clarus*を接種したネギ及びアマ(*Linum usitatissimum* L.)をそれぞれ砂耕および無菌培養した。非接種のネギを水耕培養し、根の浸出物を回収した。土壌溶液、外生菌糸の抽出物、根の抽出物及び根の浸出物をSDS-PAGEで解析した。

3-2 外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件下における応答

菌糸区画と菌根区画を設けるために2コンパートメントポットを使用した。ポットには、ネギ(*Allium fistulosum*)を滅菌黒ボク土で55日間栽培した。AM菌には *Rhizophagus clarus* を使用し、非接種区と接種区それぞれに0 (P0) と0.5 g P₂O₅ kg⁻¹ (P5)のリン処理を設けた。酸性ホスファターゼ活性を測定するために、40、45、50、55日目に菌糸区画の土壌溶液を採取した。p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩六水和物を基質溶液とし、酸性ホスファターゼ活性を検出した。さらに、土壌溶液を濃縮し、SDS-PAGEで解析を行った。また、菌根形成率、地上部リン含有率、地上部乾物重を測定した。アマ毛状根に *R. clarus* を接種し、2段階のリン濃度(3および30 µM)の培地を含む2コンパートメントペトリ皿で生育させた。

4. 研究成果

4-1 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の浸出物からの酸性ホスファターゼの浸出

ゲルの活性染色により187 kDaのACP活性が接種区の土壌溶液および砂耕培養と無菌培養で得られた外生菌糸の抽出物から検出され、水耕の非接種の根の浸出物および抽出物からは菌根形成の有無に関わらず検出されなかった。これらことから土耕による土壌溶液中のACP活性は *R. clarus* 由来であることが示唆された。

4-2 外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件下における応答

ネギの菌根形成率は接種区で70~80%だった。地上部リン含有率は、いずれのリン処理でも非接種区より接種区の方が高かった。地上部乾物重は、P5では非接種区と比べて接種区が高かったが、P0では両区間に差はなかった。酸性ホスファターゼ活性は非接種区に比べて接種区が高く、さらに40日目ではP5の接種区よりP0の接種区が高かった。SDS-PAGEより、接種区で187 kDaのACP活性が検出されたが、非接種区ではみられなかった。また、活性の強さはP5よりP0が高かった。菌糸コンパートメント中の外生菌糸表面および培地中のACP活性は、3 µMで30 µM

より高かった。これらの結果より、*R. clarus* CK001 は土壌中のリン段階に応答して酸性ホスファターゼを外生菌糸から浸出させていることが示された。

<引用文献>

- ① Condrón LM, Turner BL & Cade-Menun BJ 2005: Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In: Sims JT & Sharpley AN (eds) Phosphorus: Agriculture and the environment, pp 87-122. American Society of Agronomy, Madison.
- ② Tarafdar JC & Marschner H 1994: Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biol. Biochem.* 26, 387-395.
- ③ Jayakumar P & Tan TK 2005: Phosphorus solubilization by ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* in pure culture and in association with *Acacia mangium*. *Symbiosis* 39, 125-130.
- ④ Tawarayama K, Naito M, Wagatsuma T 2006: Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Nutr.* 29, 657-665.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Sato T, Cheng WG & Tawarayama K 2018: Effects of indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Allium fistulosum* under field conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 64, 705-709. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2018.1543534
- ② George TS, Giles CD, Menezes-Blackburn D et al. (86人中80番目) 2018: Organic phosphorus in the terrestrial environment: a perspective on the state of the art and future priorities (vol 427, pg 191, 2018). *Plant Soil* 427, 209-211. 査読有. DOI: 10.1007/s11104-017-3488-2
- ③ Wulandari D, Saridi, Cheng WG & Tawarayama K 2016: Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improves *Albizia saman* and *Paraserianthes falcataria* growth in post-opencast coal mine field in East Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecol Manag* 376, 67-73. 査読有. DOI: 10.1016/j.foreco.2016.06.008
- ④ Sato T, Ezawa T, Cheng WG & Tawarayama K 2015: Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Soil Science and Plant Nutrition* 61, 269-274. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298

〔学会発表〕(計6件)

Sato, T., Hachiya, S., Inamura, N., Ezawa, T., Cheng, W., Tawarayama, K. Acid phosphatase activity in hyphal exudate of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* under low P condition. *Phosphorus in Soils and Plants*, Belgium, 2018

佐藤 匠、江沢辰広、程 為国、俵谷 圭太郎 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の菌種間差 日本土壤肥料学会 2018 年度神奈川大会, 2018

③ 蜂矢志保実、稲村希、佐藤匠、江沢辰広、程為国、俵谷圭太郎 アーバスキュラー菌根菌 *Rhizophagus clarus* の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の低リン酸応答 日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会 2017

④ Hachiya, S., Inamura, N., Sato, T., T. Ezawa, W. Cheng, and K. Tawarayama Low-phosphorus conditions increase release of acid phosphatase from extraradical hyphae of *Rhizophagus clarus* 9th International conference of mycorrhiza Czech Republic, 2017

Takumi Sato, Tatsuhiko Ezawa, Weiguo Cheng and Keitaro Tawarayama Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* under low P condition *Organic Phosphorus* 2016

佐藤匠、江沢辰広、程為国、俵谷圭太郎 低リン条件におけるアーバスキュラー菌根菌 *Rhizophagus clarus* の外生菌糸による酸性ホスファターゼの浸出 日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会 2015

〔図書〕(計1件)

Tawarayama K & Turjaman M 2016: Mycorrhizal Fungi in Peatland. In: Osaki M & Tsuji N (eds) *Tropical Peatland Ecosystems*, pp 237-244. Springer, Tokyo.

〔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：
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：
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

俵谷圭太郎(TAWARAYA, Keitaro)

山形大学・農学部・教授

研究者番号(8桁): 70179919

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

なし

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。