

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380044

研究課題名 (和文) 菌根共生系の窒素代謝機構とその土壤圏の窒素循環における意義

研究課題名 (英文) Mechanisms of nitrogen metabolism in mycorrhizal symbiosis and its significance in terrestrial nitrogen cycling

研究代表者

齋藤 雅典 (SAITO MASANORI)

東北大学・大学院農学研究所・教授

研究者番号：40355079

研究成果の概要 (和文)：

植物とアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) との共生システムにおいて、窒素が AM 菌の生育や AM 菌の植物への窒素吸収へどのように関与しているか、その生理機構について研究を行った。AM 菌菌糸におけるポリリン酸合成、すなわち AM 菌によるリン酸吸収は無機態窒素の吸収同化と共役していることを示唆する結果を得た。さらに、土壤中の無機態窒素濃度が AM 菌のリン酸吸収に影響を及ぼし、窒素が欠乏する条件では AM 菌のリン酸吸収が制限され得ることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

In arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis which is comprised of plant and AM fungi, we investigated how N affects AM fungal function and physiology. We obtained the results suggesting that polyphosphate accumulation in AM fungal hyphae which is an index of the fungal P uptake is coupled with N assimilation, and also suggesting that AM fungal P uptake is regulated by soil mineral N concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：土壌生物、植物栄養、共生、アーバスキュラー菌根菌、ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の8割以上の種が菌類と「菌根共生」を形成し、菌根共生系が植物群落の構造と機能、そして土壤圏における物質循環に大きな影響を及ぼしていることはよく知られている。草本植物類に共生する絶対共生のア

ーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) については、もっぱら植物のリン酸吸収を促進する形でリン (P) 循環に寄与していると考えられてきたが、最近、AM 菌の窒素 (N) 吸収について新たな知見が集積しつつある。申請者らは、

これまでに、根と菌糸を分割した根箱法により、菌糸からの窒素吸収によって植物の生育が改善されることを初めて示すことに成功した(科研費 18380035)。さらに最近の知見を踏まえると、AM 菌が P だけでなく、N についても宿主植物へ供給しており、そのことによって土壌圏の N 循環に寄与していることが示唆されている。「自然界において AM 菌は植物の窒素吸収に何らかの寄与をしており、植物と AM 菌の共生は宿主植物の窒素栄養による制御機構が存在する」という仮説を提起できる。そこで、本研究では本仮説を証明するための最初のステップとして、AM 菌の生理と代謝機能に関する以下の研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では、植物とアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) との共生システムにおいて、AM 菌の植物の窒素吸収への寄与、および窒素に関わる代謝制御機構を解明し、土壌圏窒素循環における AM 共生の意義を探ることを目的とする。

(1) 土壌窒素濃度が AM 菌の生育に及ぼす影響を、孢子形成の面から検討するとともに、AM 菌のリン吸収の指標としてポリリン酸に着目し、AM 菌接種植物の生育および根内のポリリン酸蓄積パターンの変化から、植物の生育と根内のポリリン酸との関係を検討するとともに、AM 菌のリン吸収が土壌中の無機態窒素によって影響を受けるか否か検討した。

(2) AM 菌糸で吸収された無機態 N はアルギニンに変換され、内生菌糸へ移行する。アルギニンは菌糸内で最も多いアミノ酸であり、遊離アミノ酸の 90% 以上を占める。菌糸液胞内でポリリン酸のカウンターカチオンとして存在し、AM 菌における N と P 吸収に重要な役割を果たしていると考えられる。

しかし、アルギニンが細胞内のどの部位に局在し、どのようなメカニズムで移行するのか、あるいはアルギニンとポリリン酸の関係についてはほとんど分かっていない。そこで、アルギニンに特異的に結合する酵素を標識して酵素免疫化学的手法で細胞レベルでのアルギニン検出法を開発するとともに、これまで開発してきたポリリン酸の細胞内局在の観察法と組み合わせて、菌根菌細胞内における窒素とリンの局在を解析した。

(3) AM 菌の樹枝状体で強く発現しているアルカリホスファターゼ (ALP) は、AM 菌のリン酸代謝に何らかの重要な機能を果たしていると推測されてきたが、その機能は依然不明である。そこで、ALP に着目し、植物側の窒素栄養あるいは環境中の N 濃度が AM 菌の ALP 遺伝子の発現に如何に関与するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 窒素が AM 菌の生育と P 吸収に及ぼす影響:

① 土壌可給態窒素がきわめて欠乏している土壌として、雲仙普賢岳火山噴出物を培地として用い、5 種類のイネ科草本 (ワセオバナ、ホクチガヤ、ススキ、バヒアグラス、ウィーピングラブグラス) に AM 菌 *Glomus etunicatum* 単独、あるいは同種と *Gigaspora margarita* の混合で、接種し、窒素添加 (20mgN/kg soil) の有無を組み合わせ、宿主植物の生育と孢子形成量を調査した。

② 4 段階のリン酸を添加した培土 (以下 P0、P1、P2、P3) を用い、*Glomus sp.* R10 および *G. etunicatum* をそれぞれ長ネギに接種して 8 週間栽培し、各リン酸レベルにおける植物の生育、AM 菌感染率、根内のポリリン酸を比較した。ポリリン酸定量法として、測定感度が非常に高いが短鎖ポリリン酸に対す

る定量性が低い PPK 法と、PPK 法に比べて感度は低いものの短鎖定量性が高い PPX 法を併用した。PPK 法による測定値を長鎖ポリリン酸、PPX 法による測定値を全ポリリン酸、PPX 測定値－PPK 測定値を短鎖ポリリン酸とした。

③ 砂耕条件で長ネギ幼植物に *Glomus intraradices* を感染させ 5 週間栽培した。その後、砂培地中の養分を脱塩水で洗い流して根・外生菌糸への養分供給を絶つ処理を行った。1 週間後、重窒素標識硝酸アンモニウムを無添加 (N0 区)、ポットあたり 1 mg N (N1 区) および 10 mg N (N10 区) 添加する各処理区を設けた。またこの際、各ポットに同量のリン酸 (1.4mg P) を添加した。窒素処理時、窒素処理 3 日後および 7 日後にポットを解体し、養分吸収量、植物根・外生菌糸のポリリン酸量 (PPK 法および PPX 法) 等を測定した。

(2) 窒素の主要移行態であるアルギニンの細胞内局在性：

アルギニンの検出には、アミノ酸に特異的結合性を示すアミノアシル tRNA 合成酵素を利用する方法を検討した。検出法の原理は、菌根の固定試料に組換えアルギニン tRNA 合成酵素 (Xpress エピトープタグを含む) を結合させ、エピトープタグを指標に蛍光抗体法や免疫電顕法によりアルギニンを検出するものである。ポリリン酸の検出には、ポリリン酸に特異的に結合するポリリン酸結合タンパク質を用いた免疫電顕で行った。観察試料には、*G. intraradices* を接種したミヤコグサ菌根を用いた。菌根を 4% パラフォルムアルデヒドと 5% グルタルアルデヒドで固定し、Spurr 樹脂に包埋した薄切切片を作製し観察試料とした。ポリリン酸を検出するため、切片を過酸化水素水でエッチング処理し、ポリリン酸結合タンパク質と抗 Xpress 抗体を含む一次反応液に

浸漬し、続いて金コロイド標識二次抗体で反応することによってポリリン酸をラベルした。観察には透過型電子顕微鏡を用いた。

(3) 植物側の窒素栄養が菌根菌の窒素・リン代謝に及ぼす影響：

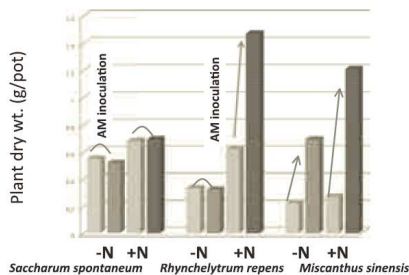
長ネギを 0.5 mM KNO₃ および 0.05 mM KH₂PO₄ を含む改変ホーランド水耕液を用いて砂耕栽培し、AM 菌 *G. intraradices* を感染させ、6 週間栽培した後に葉面に蒸留水または 5 mM KNO₃ を撒布し 1 週間栽培した。その後、感染根から全 RNA を抽出し AM 菌の ALP 遺伝子の発現レベルを RT-PCR により解析した。また、ミヤコグサにおいても KNO₃ 濃度がアルカリホスファターゼ遺伝子の発現に及ぼす影響を調査した。この場合は、AM 菌が感染したミヤコグサを、葉面からの KNO₃ 投与ではなく、10 mM もしくは 10 μM の KNO₃ を含む改変ホーランド水耕液 (リン酸含量は上記と同様に 0.05 mM KH₂PO₄ である) を用いて砂耕栽培をし、AM 菌を感染させてから 6 週間後に感染根を採取し、ALP 遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 窒素が AM 菌の生育と P 吸収に及ぼす影響：

① AM 菌接種により生育促進効果を示す植物 (ススキ、バヒアグラス) は、窒素添加によって生育と胞子の形成が増加した。一方、AM 菌接種により明確な接種効果を示さない植物 (ワセオバナ、ウィーピングラブグラス) の場合、窒素添加によっても胞子形成は減少あるいは増加しなかった。このような窒素が胞子形成に及ぼす傾向は、*G. etunicatum* と *Gigaspora margarita* の AM 菌 2 種を共接種した場合にも認められた。このことは、AM 菌の

胞子形成に及ぼす窒素の影響は植物の種類に異なること、また、植物の種類によっては窒素が胞子形成を抑制することを示している。このことは、条件によっては、窒素がリン酸と同様に共生状態にある AM 菌の生育を制御していることを示唆するものである。



②各 AM 菌接种植物の生育量は培土のリン酸レベルが高くなるにつれ増加した。しかし接種効果が最も大きかったリン酸レベルは、*Glomus* sp. R10 は P3、*G. etunicatum* は P1 と異なっていた。また *Glomus* sp. R10 感染根では培土のリン酸レベルが高くなるにつれて PPK / PPX 値が減少したが、*G. etunicatum* 感染根では P0 を除きほぼ一定だった。根内の短鎖ポリリン酸量と植物の生育との間には、菌の種類によらず高い相関関係が認められたが、特に *Glomus* sp. R10 では長鎖ポリリン酸と植物の生育との間に明確な関係性は認められなかった。このことから、AM 菌感染根内の短鎖ポリリン酸は AM 菌から植物へ供給されるリン酸のプールとしての機能を持つ可能性が示唆された。

③窒素添加 (N1, N10) によって、N0 区に比べ、AM 菌感染率は上昇した。外生菌糸の全ポリリン酸濃度 (PPX 法、タンパク当たり) は、窒素添加により 3 日目に N1 区で N0 区の約 2 倍、N10 区では 3 倍以上に上昇したが、7 日目にはほぼ窒素処理時の濃度に低下した。根中の全ポリリン酸濃度も同様に窒素添加により 3 日目には大きく上昇し、7 日目には低下した。しかし、7 日目も N1・N10 区は

N0 区より有意に高かった。外生菌糸および根中の長鎖ポリリン酸濃度 (PPK 法) もほぼ同様の変動を示した。これらのことは、AM 菌の増殖ならび AM 菌によるリン酸吸収が無機態窒素によって制御されていることを示している。また、外生菌糸中のポリリン酸濃度と重窒素 atom% に高い相関が見いだされ、菌糸におけるポリリン酸合成と窒素吸収が密接な関係にあることが示唆された。

(2) 窒素の主要移行態であるアルギニンの細胞内局在性

アルギニン検出のため、大腸菌からアルギニン tRNA 合成酵素をクローニングし、大腸菌発現系でアルギニン tRNA 合成酵素の発現・精製を試みた。しかし、十分な量の酵素を得ることができず、アルギニンの局在を解析することができなかつた。ポリリン酸局在を電子顕微鏡レベルで詳細に解析した結果、細胞間菌糸やトランク菌糸の細胞壁にポリリン酸が検出されたが、ファインブランチの細胞壁にはポリリン酸が検出されなかつた (図)。ファインブランチでポリリン酸が検出されなかつた理由として、樹枝状体のポリリン酸の鎖長が短くポリリン酸結合タンパク質で検出できなかつた可能性や、ポリリン酸がオルトリン酸まで分解された可能性が考えられる。ポリリン酸は成熟した樹枝状体だけでなく、崩壊した樹枝状体にも観察された。

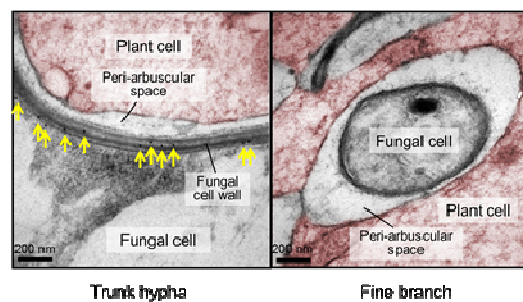


図. 樹枝状体のトランク菌糸とファインブランチ

ンチ菌糸のポリリン酸局在。赤の領域は植物細胞を示し、灰色の領域は菌根菌および境界域を示す。黄色矢印はポリリン酸の局在を示す。トランク菌糸の細胞壁にはポリリン酸が見られるが、ファインブランチ菌糸にはポリリン酸が観察されない。

(3) 植物側の窒素栄養が菌根菌の窒素・リン代謝に及ぼす影響

長ネギの結果としては、葉面撒布による KNO_3 添加により、感染根内のALP遺伝子の発現は変化しなかった。この実験系においては、硝酸欠乏により長ネギの生長は阻害されており、硝酸を葉面撒布してもその生長が回復することがなかった。そこで、葉面撒布に代えて、水耕液中の硝酸濃度が根におけるAM菌のALP遺伝子の発現に及ぼす影響を、実験材料をモデル植物として広く用いられ遺伝子発現のデータが豊富なミヤコグサに変更した。AM菌が感染したミヤコグサを10 mM および10 μM の KNO_3 条件下で栽培した場合でも、AM菌のALP遺伝子の発現は両者において有意差はなかった。これらの結果から、環境中の硝酸濃度がAM菌のALP遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上一連の研究により、AM菌の生理機能に及ぼすNの制御機構について十分に解明することができなかったものの、AM菌のN吸収とP吸収が密接に関連していること、土壌無機態窒素濃度によってAM菌のP吸収および生育に影響を受けることが明らかになった。

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12件)

① Saito, M., Oba, H., Kojima, T. Effect of nitrogen on the sporulation of

arbuscular mycorrhizal fungi colonizing several gramineous plant species, *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有、57巻、2011年、29-34

② Yao, Q., Ohtomo, R., Saito, M. Nitrogen and phosphorus influence on polyphosphate accumulation in *Gigaspora margarita* during spore germination, *Plant and Soil*, 査読有、330巻、2010年、303-311

③ Takanishi, I., Ohtomo, R., Hayatsu, M., Saito, M. Short-chain polyphosphate in arbuscular mycorrhizal roots colonized by *Glomus* spp.: A possible phosphate pool for host plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 査読有、41巻、2009年、1571-1573

[学会発表] (計25件)

① 長田泰行、齋藤雅典、齋藤勝晴、アーバスキュラー菌根菌の樹枝状体におけるポリリン酸と酸性ホスファターゼ活性の局在、日本土壌肥料学会、2010年9月7日、北海道大学

② 高西伊吹、大友量、早津雅仁、八木一行、齋藤雅典、アーバスキュラー菌根菌のリン吸収は根圏土壌窒素濃度で制御されている、微生物生態学会大会、2009年11月22日、広島大学

[図書] (計2件)

① 齋藤勝晴、川口正代司、文一総合出版、「共進化の生態学」第8章 アーバスキュラー菌根共生から根粒共生への進化、2008、237-260 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 雅典 (SAITO MASANORI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40355079

(2) 研究分担者

齋藤 勝晴 (SAITO KATSU HARU)

信州大学・農学部・准教授

研究者番号：40444244

青野 俊裕 (AONO TOSHIHIRO)

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

教

研究者番号：10372418