

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688010

研究課題名(和文) 有機酸とホスファターゼの分泌機能増強による土壤未利用リン吸収能の向上

研究課題名(英文) Improvement of P uptake from unavailable forms in the soil by enhancement of secreting function of organic acids and phosphatase

研究代表者

和崎 淳 (WASAKI, Jun)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：00374728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：枯渇しつつあるリン酸質肥料は使用量の節約が望まれている。一方で、耕地土壤中ではリンが難利用性の形で蓄積されている。一部の植物は有機酸やホスファターゼを分泌することによって難利用性リン利用能を高めている。そこで、機能を理解し、活用する目的で本研究を実施した。難利用性リン利用能の高い植物において新たに有機酸トランスポーターを単離した。また、有機酸トランスポーターが根からの有機酸分泌に大きく貢献することを示した。また、酸性ホスファターゼや有機酸トランスポーターの発現量の増強により難利用性リンが可溶化し、植物による利用性が向上されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is expected to save amount of P fertilizer usage, because the resource is depleting. On the other hand, unavailable forms of P are accumulated in cultivated lands. Specific group of plants has ability to access the unavailable P by high ability to secrete organic acids and phosphatase. This study aimed to investigate and apply their functions. Several genes for organic acid transporter have been isolated from plants, which are able to access unavailable P. It was suggested that these transporters contributed to higher ability of organic acid exudation. It was indicated that transformation of organic acid transporter and acid phosphatase improved the availability of P in the rhizosphere soil by their mobilizing functions.

研究分野：植物栄養学・土壤微生物学

キーワード：リン 有機酸 酸性ホスファターゼ 分泌 シロバナルーピン トランスポーター 土壤未利用リン
シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

リン酸質肥料の原料であるリン鉱石資源は、経済的に採掘可能な埋蔵量はわずか数十年程度と予測されており、涸渇に瀕している。その一方で、多くの耕地土壌には難溶性リンや有機態リンの形で未利用のリンが多く蓄積している。これらの土壌未利用リンの吸収能を向上することができれば、リン酸質肥料の使用量の削減が可能となると考えられる。低リン条件でもよく生育することのできるシロバナルーピンなどの植物は土壌未利用リンの利用能が高いことから、その吸収能力を解明し、その機能を利用する試みが行われてきた。

土壌中のリンは、有機態リンが高い割合を占める。これは、有機態リンが分解されにくい蓄積することが主要因と考えられる。ただし、根や土壌微生物の分泌するホスファターゼは、土壌中の有機態リンを分解し、無機リン酸を放出することができる。これまでに、ホスファターゼの遺伝子組換えによる根圏土壌における有機態リンの利用能を向上する取り組みが行われている。土壌糸状菌由来のホスファターゼの一種であるフィターゼ遺伝子 *phyA* をシロイヌナズナに導入したときに、土壌に最も多く蓄積する有機態リン化合物のフィチン酸からのリン吸収能が向上したことも報告されている。また、我々がシロバナルーピンから単離した根分泌性酸性ホスファターゼ遺伝子 *LASAP2* をタバコに過剰発現させたところ、フィチン酸からのリン吸収能が向上した。しかしながら、これらのホスファターゼ遺伝子組み換え株を土壌で栽培した場合、有機態リンの吸収能を高める効果は限定的であることが明らかとなってきた。その原因は、土壌中に存在する有機態リンの多くは無機態リンと同様に難溶性であることによると結論づけられている。

土壌中のリンは、その多くが難溶性の形態で存在しているため、植物は直接吸収することができない。植物は、有機酸を根から分泌して、キレート能によって難溶性リンを可溶化する能力がある。ところが、有機酸の分泌を担う鍵である有機酸のトランスポーターはこれまでに同定されておらず、その機能の解明は進んでいなかった。そこで、我々はこれまでに低リン条件下で機能を発揮する有機酸トランスポーターの単離を試み、根から分泌される主要な有機酸であるリンゴ酸とクエン酸の輸送に関わるトランスポーターをシロイヌナズナから単離することに成功した。これらのトランスポーターの機能欠損株は有機酸分泌が顕著に低下することを突き止めた。この有機酸トランスポーターの機能を活用することができれば、植物による土壌未利用リンの吸収能を飛躍的に改善することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、有機酸トランスポーターと酸性

ホスファターゼの能力を活用することにより、植物による土壌未利用リンの吸収能を向上することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 有機酸トランスポーターの解析

有機酸分泌を担うトランスポーターは、アルミニウムストレス条件下で誘導されるリンゴ酸トランスポーター *ALMT* とクエン酸トランスポーター *MATE* がこれまでに報告されている。リン欠乏における有機酸分泌は分泌誘導機構がアルミニウムストレスとは異なるため、別のトランスポーターがその機能を担うことが示唆されている。我々は、これまでに低リン条件のシロイヌナズナ根で特異的に発現する *AtALMT-PII* と *AtMATE-PII* の単離に成功した。これらの遺伝子の変異株はそれぞれ低リン条件下でのリンゴ酸、クエン酸の分泌が低下することが示されている。そこで、これらの遺伝子のプロモーター領域の下流に *GUS* 遺伝子を連結した系統を育成し、プロモーター解析を行う。また、*AtALMT-PII*, *AtMATE-PII* の配列情報を基に、より輸送活性が高いことが期待されるシロバナルーピン (*Lupinus albus*) の低リン誘導型 *ALMT*, *MATE* オーソログの単離、解析を進めた。

(2) 有機酸トランスポーターと酸性ホスファターゼの単独および多重過剰発現系統の作出とリン吸収能の解析

我々はこれまでにシロバナルーピン根分泌性酸性ホスファターゼ *LASAP2* 遺伝子を単離した。難溶性有機態リンの溶解能と分解能を同時に高める目的で、*ALMT* および *MATE* 遺伝子を単独、もしくは *LASAP2* と多重に組換えたシロイヌナズナ過剰発現系統を確立した。確立された単独発現系統、多重発現系統を用いて、土耕栽培を実施し、リン吸収能の向上についての検証を行った。

(3) クラスタ根における根分泌物の解析と、根圏の微生物群集構造への影響

クラスタ根で発現誘導される抗菌性酵素の単離および微生物群集構造の解析を実施した。クラスタ根で発現誘導される遺伝子群を網羅的に解析するため、クラスタ根特異的 cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解析を実施するとともに、CE-MS を用いた根分泌物の網羅解析を実施した。また、クラスタ根圏で有機態リンの分解に関わる細菌を単離し、16S rDNA 塩基配列に基づく簡易同定を行うとともに、根圏土壌より直接 DNA を抽出し、DGGE およびクローン解析によって根圏微生物の群集構造の解析を実施した。

(4) 低リン耐性の高いヤマモガシ科およびカヤツリグサ科植物の特殊な根の形態と生理機能の解析

ヤマモガシ科のピンクッションハケア (*Hakea laurina*) およびヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis*) のクラスター根形成について水耕および土耕レベルで観察を行った。また、ハケアにおけるホスファターゼおよび有機酸トランスポーター候補遺伝子の単離を行った。さらに、日本在来カヤツリグサ科植物のダウシフォーム根形成と根圏のリン形態の調査を行い、ダウシフォーム根形成とリン吸収の関係について調査を行った。

4. 研究成果

(1) 有機酸トランスポーターの解析

シロイヌナズナより単離したリン欠乏誘導型有機酸トランスポーターのうち、リンゴ酸トランスポーター AtALMT3 およびクエン酸トランスポーター AtMATE-PII のプロモーター::GUS 発現系統を確立し、発現部位局在性を確認したところ、いずれにおいても根端上部の有機酸分泌の高い領域において強い発現が見られた。シロイヌナズナより単離したリンゴ酸トランスポーター AtALMT3 の T-DNA 挿入変異株に AtALMT3 の cDNA を組み込んだところ、そのリンゴ酸分泌能が復帰したことから、AtALMT3 がリン欠乏時のリンゴ酸分泌を担うことを裏付けた。

AtALMT3 のアミノ酸配列をもとに、有機酸分泌能の高いシロバナルーピンのオゾンログ *LaALMT-PII* の完全長 cDNA を単離した。そのアミノ酸配列から、*LaALMT-PII* は細胞膜に局在するリンゴ酸トランスポーターであることが示唆された。有機酸分泌能の高いシロバナルーピン根のクエン酸分泌を担う候補遺伝子として *LaMATE-PII* を単離した。*LaALMT-PII* と合わせて発現量を調査したところ、*LaALMT-PII* はリンゴ酸分泌能の高い若いクラスター根で、*LaMATE-PII* はクエン酸分泌能の高い成熟したクラスター根で発現量が多いことが示された。また、*LaMATE-PII* の発現はリン欠乏で形成されたクラスター根に特異的に誘導されることが示された。一方で、*LaALMT-PII* はリン欠乏だけでなくアルミニウムによっても発現が誘導されることが示された。

(2) 有機酸トランスポーターと酸性ホスファターゼの単独および多重過剰発現系統の作出とリン吸収能の解析

LaMATE-PII をリン欠乏誘導型酸性ホスファターゼ LASAP2 のプロモーター制御下で発現するシロイヌナズナコンストラクト (LpMA 系統)、*LaMATE-PII* と LASAP2 を同時に発現するコンストラクト (LpLAMA 系統)、LASAP2 のみを発現するコンストラクト (LpLA 系統) を用いて土耕栽培を行った。その結果、可給態リンが少ない条件下で、野生株よりも全ての組み換え系統で生育とリン吸収の向上が示唆された。一方、有機酸分泌と酸性ホスファターゼ分泌の両方の効果が期待された LpLAMA 系統では LpMA 系統と同

程度の生育であり、相乗的な効果は観察されなかった。

(3) クラスター根における根分泌物の解析と、根圏の微生物群集構造への影響

クラスター根圏から単離したフィチン酸分解細菌の性質を調査したところ、若いクラスター根でリンゴ酸、成熟したクラスター根でクエン酸を資化する細菌の割合がそれぞれ高く、フィチン酸の可給化には有機酸の分泌に伴って変化する細菌群集が強い影響を及ぼすことが示唆された。

標準リン条件、リン欠乏条件で栽培したシロバナルーピンの根での遺伝子発現および根分泌物と根の抽出物に含まれる代謝産物の解析を行った結果、リン欠乏条件で膨大な量の有機酸分泌が増加するほか、アミノ酸など複数の化合物が多く分泌されることが明らかとなった。シロバナルーピン根圏で見られる特異的な微生物群集構造の変化には、基質としての有機酸分泌だけでなく、これらの分泌物質が影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(4) 低リン耐性の高いヤマモガシ科およびカヤツリグサ科植物の特殊な根の形態と生理機能の解析

クラスター根を形成し、低リン条件下でもよく生育する木本植物ピンクッションハケアからクラスター根特異的に発現する酸性ホスファターゼ *HISAP1* の完全長 cDNA を単離し、そのアミノ酸配列から、*HISAP1* は分泌型タンパク質であることが示唆された。また、ピンクッションハケアが形成したクラスター根の根分泌物を分析したところ、多量のリンゴ酸、クエン酸が多く含まれた。この植物から AtALMT3 および AtMATE-PII のオゾンログと考えられる *HIALMT-PII* および *HIMATE-PII* の単離に成功した。これらの遺伝子は、有機酸分泌の多いクラスター根で発現量が多いことが示された。

日本に唯一生息するヤマモガシ科植物であるヤマモガシの根がクラスター根を形成していることを発見した。また、このクラスター根は極めて高い酸性ホスファターゼと有機酸分泌能を有していることを見いだした。また、ヤマモガシにおける葉のリン含有率は極めて低いことから、土壤中からのリン吸収能力に長けているのみならず、高いリンリサイクリング能力も有していることが示唆された。

日本に自生するカヤツリグサ科植物が低リン土壌条件でクラスター根と似た役割を果たすダウシフォーム根を形成することを見いだした。また、ダウシフォーム根を多く形成する個体ではその根圏での難利用性リンの有効利用が行われていることを見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. 和崎 淳、丸山 隼人. リン循環に関わる生物の機能に迫る分子生物学的手法. *地球環境*, (accepted for publication). 査読有. http://www.airies.or.jp/journal_chikyukankyo.html
2. 山内 大輝、丸山 隼人、内田 慎治、向井 誠二、坪田 博美、和崎 淳. (2015) 日本産ヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis* Lour., ヤマモガシ科) のクラスター根の発見. *植物研究雑誌*. **90**(2), 103-108. 査読有. <http://www.tsumura.co.jp/kampo/plant/top/>
3. Dissanayaka, D.M.S.B., Maruyama, H., Masuda, G., Wasaki, J. (2015) Interspecific facilitation of P acquisition in the intercropping of maize with white lupin in two contrasting soils as influenced by different rates and forms of P supply. *Plant and Soil*, **390**(1), 223-236. doi: 10.1007/s11104-015-2392-x. 査読有.
4. 和崎 淳、丸山 隼人、俵谷 圭太郎. (2015) 植物栄養学を生かした農業生産技術について. 3.リン酸栄養について - 植物における難利用性リンの有効利用法 -. (講座) *日本土壤肥科学雑誌*, **86**(3), 213-218. 査読有. <http://jssspn.jp/book/magazine.html>
5. 和崎 淳. (2013) 植物による難利用性リン酸利用のしくみと活用の可能性. *土づくりとエコ農業*, **45**(513), 10-15. 査読無. <http://www.japan-soil.net/publication.html>
6. Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. (2013) Phytate degradation by fungi and bacteria that inhabit sawdust and coffee residue composts. *Microbes and Environments*, **28**(1), 71-80. doi: 10.1264/jsme2.ME12083. 査読有.
7. Maruyama, H., Yamamura, T., Kaneko, Y., Matsui, H., Watanabe, T., Shinano, T., Osaki, M., Wasaki, J. (2012) Effect of exogenous phosphatase and phytase activities on organic phosphate mobilization in soils with different phosphate adsorption capacities. *Soil Science and Plant Nutrition*, **58**(1), 41-51. doi: 10.1080/00380768.2012.656298. 査読有.
8. Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. (2012) Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes and Environments*, **27**(3), 226-233. doi: 10.1264/jsme2.ME11299. 査読有.
9. 俵谷 圭太郎、和崎 淳. (2012) リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究. 1. 講座のねらい. (講座) *日本土壤肥科学雑誌*, **83**(2), 173-176. 査読有. <http://jssspn.jp/book/magazine.html>
10. 和崎 淳. (2012) リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究. 2. 有機態リン酸の利用. (講座) *日本土壤肥科学雑誌*, **83**(2), 177-182. 査読有. <http://jssspn.jp/book/magazine.html>
11. 瀬戸 二郎、加藤 直人、末吉 邦、和崎 淳、森塚 直樹、金田 吉弘、関本 均. (2012) 植物の養分獲得・利用と施肥. (資料) *日本土壤肥科学雑誌*, **83**(4), 471-477. 査読有. <http://jssspn.jp/book/magazine.html>
12. Shinano, T., Komatsu, S., Yoshimura, T., Tokutake, S., Kong, F.J., Watanabe, T., Wasaki, J., Osaki, M. (2011) Proteomic analysis of secreted proteins from aseptically grown rice. *Phytochemistry*, **72**(4-5), 302-311. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.12.006. 査読有.
13. Wickramatilake, A.R.P., Munehiro, R., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. (2011) Compost amendment enhances population and composition of phosphate solubilizing bacteria and improves phosphorus availability in granitic regosols. *Soil Science and Plant Nutrition*, **57**(4), 529-540. doi: 10.1080/00380768.2011.600243. 査読有.
14. Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. (2011) Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts. *Microbes and Environments*, **26**(3), 220-227. doi: 10.1264/jsme2.ME10210. 査読有.

〔学会発表〕(計 36 件)

1. Wasaki, J., Yamauchi, T., Takahashi, J., Maruyama, H., Uchida, S., Mukai, S. and Tsubota, H. Growth condition and P mobilizing properties of cluster roots of *Helicia cochinchinensis* (Proteaceae) at Miyajima Island, Japan. 2015.6.22. Rhizosphere 4, Maastricht (the Netherlands)
2. Maruyama, H., Yamauchi, T., Kohama, T., Watanabe, T., Wasaki, J. Physiological responses of *Hakea laurina* (Proteaceae) to low-P and high-P conditions. 2014.8. 5th International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum, Montpellier (France)
3. 丸山 隼人、津村 暁彦、海野 佑介、及川 彰、俵谷 圭太郎、信濃 卓郎、和崎 淳. De novo RNA-seq と CE-TOF/MS による代謝産物プロファイリングに基づくシロバナルーピンの低リン耐性機構の解析. 2014.3.19. 第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学 (富山市)
4. 柘田 元気、和崎 淳. ナキリスゲ (*Carex lenta*) のダウシフォーム根形成に与える土壌リンの影響. 2014.3.16. 第 61 回日本生態学会大会、広島国際会議場 (広島市)
5. 山内 大輝、内田 慎治、向井 誠二、坪

- 田 博美、和崎 淳. 日本在来のヤマモガシ科ヤマモガシから奇妙な形の「クラスタ根」を発見した. 2014.3.16. 第 61 回日本生態学会大会、広島国際会議場（広島市）
6. 丸山 隼人、山内 大輝、小濱 卓郎、和崎 淳. ヤマモガシ科植物 *Hakea laurina* の低リン耐性機構に関わる遺伝子の解析. 2013.9.11. 日本土壌肥料学会 2013 年度名古屋大会、名古屋大学（名古屋市）
 7. Maruyama, H., Unno, Y., Shinano, T., Wasaki, J. *De novo* sequencing and analysis of the white lupin root comparative transcriptome using a 454 GS Junior platform to discover putative genes involved in phosphorus deficiency. 2013.8.19. 17th International Plant Nutrition Colloquium, Istanbul (Turkey)
 8. Maruyama, H., Sasaki, T., Wasaki, J. AtALMT3 is a malate transporter induced in roots of phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. 2013.3.25. International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, Kurashiki (Japan)
 9. 柘田 元気、白川 勝信、和崎 淳. 日本に生育するカヤツリグサ科植物のダウシフォーム根形成に土壌リン濃度は影響するか. 2013.3.6. 第 60 回日本生態学会大会、静岡県コンベンションアーツセンター（静岡市）
 10. Maruyama, H., Kohama, T., Yamazaki, Y., Oikawa, A., Tawaraya, K., Wasaki, J. Physiological responses of *Hakea laurina* (Proteaceae) to low-P conditions. 2012.12.11. Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture IV., Perth (Australia)
 11. Masuda, G., Shirakawa, K., Wasaki, J. “Dauciform roots” of Japanese native Cyperaceae (sedge) and involvement of phosphorus status. 2012.12.11. Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture IV., Perth (Australia)
 12. 丸山 隼人、小濱 卓郎、和崎 淳. ヤマモガシ科植物 *Hakea laurina* の低リン耐性機構の解析. 2012.9.9. 日本土壌肥料学会 2012 年度鳥取大会、鳥取大学（鳥取市）
 13. 松崎 弘佑、丸山 隼人、和崎 淳. ルーピンの根圏における細菌群集と有機態リンの動態に及ぼす有機酸の影響. 2012.9.9. 日本土壌肥料学会、鳥取大学（鳥取市）
 14. 矢倉 興土、丸山 隼人、佐々木 孝行、和崎 淳. シロバナルーピンのクラスタ根から単離した ALMT ホモログの解析. 2012.9.9. 日本土壌肥料学会 2012 年度鳥取大会、鳥取大学（鳥取市）
 15. 丸山 隼人、佐々木 孝行、岡崎 圭毅、信濃 卓郎、和崎 淳. リン欠乏及びアルミニウム障害時におけるシロイヌナズナ野生株およびリンゴ酸分泌変異株の根浸出物の解析. 2012.3.18. 日本植物生理学会、京都産業大学（京都市）
 16. 和崎 淳、丸山 隼人. ヤマモガシ科植物 *Hakea laurina* の低リン耐性における酸性ホスファターゼホモログの役割. 2012.3.17. 日本植物生理学会、京都産業大学（京都市）
 17. Maruyama, H., Sasaki, T., Okazaki, K., Kojima, S., Shinano, T., Wasaki, J. Analysis of malate and citrate transporters induced in roots of phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. 2011.9.29. Rhizosphere 3 International Conference, Perth (Australia)
 18. Furutani, A., Maruyama, H., Kojima, S., Okazaki, K., Shinano, T., Wasaki, J. Characterization of phosphate utilization in *Arabidopsis thaliana* natural accessions grown on soil. 2011.9.28. Rhizosphere 3 International Conference, Perth (Australia)
 19. 丸山 隼人、佐々木 孝行、小島 創一、和崎 淳. リン欠乏シロイヌナズナ根からのリンゴ酸およびクエン酸分泌に関わるトランスポーターの解析. 2011.8.9. 日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会、つくば国際会議場（茨城県つくば市）
 20. Maruyama, H., Sasaki, T., Kojima, S., Wasaki, J. Analysis of malate transporters induced in roots of phosphorus deficient or aluminum stressed *Arabidopsis thaliana*. 2011.6.24. International Conference on Arabidopsis Research 2011, Madison, WI (USA)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. Watanabe, T., Khan, M.S.H., Rao, I.M., Wasaki, J., Shinano, T., Ishitani, M., Koyama, K., Ishikawa, S., Tawaraya, K., Nanamori, M., Ueki, N., Wagatsuma T. (2011) Physiological and biochemical mechanisms of plant adaptation to low-fertility acid soils of the tropics: The case of Brachiariagrasses. *In Principles, Application and Assessment in Soil Science*. pp. 87-116. Intech, Rijeka, Croatia.
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/rhizo/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
和崎 淳 (WASAKI, Jun)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授
研究者番号：00374728