

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850039

研究課題名(和文) AM菌とフィチン分解菌のインタラクションによる新しいフィチン分解メカニズムの探索

研究課題名(英文) Investigation of new phytate degrading mechanisms by interaction of AM fungi and phytate degrading bacteria

研究代表者

原 新太郎 (HARA, Shintaro)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・特別教育研究教員

研究者番号：10647019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：フィチン酸(IHP)は土壌中の有機態リンの主要な形態の一つであり、IHP分解は植物-土壌圏でのリン循環において重要な役割を果たすと考えられる。アーバスキュラー菌根(AM)菌は土壌から無機態リンを吸収するが、IHPを分解して無機態リンを取り出すことができない。近年、AM菌がIHP分解菌の関与によりIHP由来リンを吸収することが示されたが、どのような細菌が関与しているかは明らかになっていなかった。本研究では、アルギン酸ビーズを用いた改変釣り餌法により、AM菌菌糸圏のIHP周辺で優占するIHP分解菌の分離に成功した。これらの株はAM菌を介したIHP由来リンの吸収に関与すると考えられた。

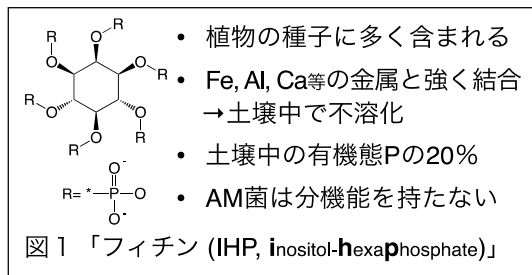
研究成果の概要(英文)：Phytate is one of major organic P compounds in soil. Phytate decomposition in soil may be one of important P flows in P cycling in soil-plant system. It is well known that arbuscular mycorrhizal (AM) fungi absorb inorganic phosphate from soil and supply it to plant. However, AM fungi lack extracellular phytase. Currently, AM fungal hyphal mediation of P flow from phytate to plant with phytate degrading bacteria was shown. However, it is not clear what kind of phytate degrading bacteria are involved in this process. In this study, we successfully isolated dominant phytate-degrading bacteria from phytate in an AM fungal hyphal compartment using a modified baiting method involving alginate beads containing phytate. These strains may contribute to P transfer from phytate via AM fungi.

研究分野：soil microbiology

キーワード：フィチン酸、アーバスキュラー菌根菌、Sphingomonas sp.、Caulobacter sp.、Arthrobacter sp.、アルギン酸ビーズ

1. 研究開始当初の背景

窒素やリン(P)などの化学肥料を大量に投入する多収型農法が主流となつて久しく、化学肥料の原料となる資源の枯渇、化学肥料の製造段階での環境汚染、化学肥料の土壌中への残留による環境汚染などといった様々な問題が発生している。長年にわたる大量のP肥料施肥の結果、耕地土壌中に大量のPが蓄積しており、有機態Pはそのうちの50~80%を占めるとされる。有機態Pの中でも特に植物や微生物による分解をうけにくい「フィチン(以下IHP, 図1)」は有機態Pの20%程度を占めると考えられており、土壌に蓄積したIHPを効率的に利用することができればP肥料の利用を軽減することが可能となる。植物のP吸収を助ける微生物として、アーバスキュラー菌根(AM)菌がよく知られている。AM菌は陸上植物の8割以上と共生関係を構築し、植物根から土壌中へ伸長したAM菌菌糸が離れた土壌からの無機態Pを輸送する。しかし、AM菌はIHPをはじめとする有機態Pを吸収することができず、有機態Pを分解して無機態Pを放出することもできないため、AM菌単独ではIHPに含まれるPを吸収することができない。



植物がAM菌を介してIHP由来Pを吸収する例がいくつか報告されていることから^[1], AM菌以外の微生物がIHPを分解し、AM菌にP酸を受け渡すメカニズムの存在が推定される。しかし、多くのIHP分解微生物(細菌, 糸状菌)が環境中から分離されているにもかかわらず、土壌中での働きに関しては未解明な点が多く、AM菌にIHP由来の無機態Pを供給するIHP分解微生物も特定されていない。また、単純に外部からIHP分解菌を接種してもAM菌によるP輸送量は増加せず^[2], “AM菌にIHP由来Pを供給するIHP分解菌”の正体は明らかになっていない。AM菌の宿主植物がその光合成産物の10~20%をAM菌に供給することからわかるように、土壌中には膨大なAM菌菌糸が存在する。また、IHPも土壌に大量に蓄積しているため、IHP由来PをAM菌に供給するIHP分解菌は環境中のP循環において重要な役割を果たすと予想される。

酸性条件下において、IHPは土壌に大量に存在する鉄(Fe)やアルミニウムと強固に結合するため非常に安定で分解されにくく、微生物による分解がほとんどないと考えられている。実際に、Fe-IHPから無機態Pを放出する微生物に関する報告はほとんどない。

2. 研究の目的

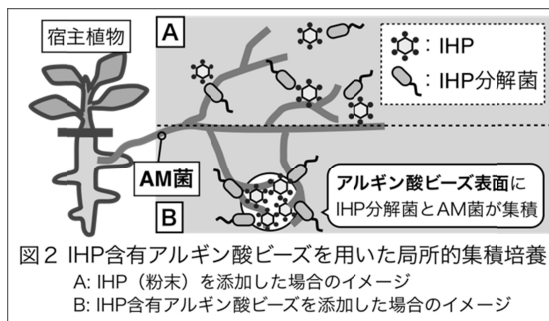
本研究では、AM菌がIHP由来Pを吸収する際にその周辺に存在が疑われる“AM菌にIHP由来Pを供給するIHP分解菌”の特定および分離を目的とする。IHP由来P吸収に關与するAM菌とIHP分解菌の組合せが取得できれば、これらを使ったモデル系の構築が可能となり、土壌中でのIHP分解におけるAM菌とIHP分解菌の關係性を解き明かす一助となる。

3. 研究の方法

これまで行われたAM菌によるIHP由来P吸収に関する先行研究では、滅菌土壌にAM菌胞子とIHP分解菌を接種する方法がとられていたが^[1,2], Zhangらの報告ではIHP分解菌の接種によるIHP分解は促進されたものの、AM菌のIHP由来P吸収は促進されなかった^[2]。そのため、AM菌とIHP分解菌の組合せによってはIHP分解菌はIHP分解で生じた無機態PをAM菌に供給しない可能性が示唆されていた。そこで、本研究では不特定多数のIHP分解菌が含まれる畑土壌(未滅菌)をIHP分解菌の接種源とし、接種するAM菌標準菌株と相性の良いIHP分解菌を栽培試験で集積し、そこからIHP分解菌を分離することとした。

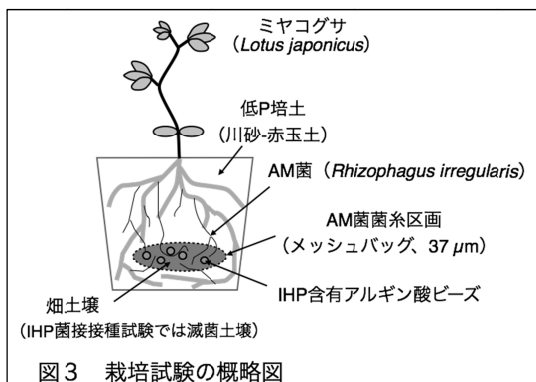
AM菌にIHP由来Pを供給するIHP分解菌は、i) 植物根ではなくAM菌がIHP由来Pを吸収することが確認された場合に、ii) IHP周辺で優占するIHP分解菌である可能性が高い。i)に関しては、植物根は通さずAM菌菌糸の侵入が可能な菌糸区画(37 μmメッシュで作成したメッシュバッグ)をAM菌が感染した植物を栽培するポットに設置し、その中にIHP添加もしくは無添加の条件で、IHP添加で宿主植物のP吸収量が増加した場合に、AM菌を介してIHP由来Pが吸収されたことが確認できる。また、ii)に関しては、粉末であるIHPをアルギン酸ビーズに保持させてメッシュバッグに添加することにより、解決を試みた。そもそも、AM菌菌糸は細くもろいため土壌からの回収が困難であり、菌糸圏にある微生物の分離・解析において大きな問題となる。もし菌糸を含む土壌全体を対象にすると、菌糸圏以外の土壌微生物の混入が多くなってしまう(図2-A)。さらに、IHP分解菌はIHP周辺に集まるが、粉末であるIHPを土壌中から回収することは困難である。そのため、AM菌とIHP分解菌の境界に分布するIHP分解菌の分離は非常に困難であった。そこで、“IHP含有アルギン酸ビーズを用いた局所的集積培養”により、二つの問題点を同時に解決する。IHP含有アルギン酸ビーズ表面にはIHP分解菌が集積され、AM菌がIHP由来Pを吸収する際は菌糸もその周りに集まる(図2-B)。アルギン酸ビーズ自体は微生物の生育に影響せず短期間では分解されないため、土壌からの回収は容易である。よって、栽培試験で宿主植物がAM菌を介してアルギン酸ビーズ中のIHP由来Pを吸収することを確認し、回収したアルギン酸ビーズからIHP分解菌を

分離することが可能になると考えた。



(1) 菌根菌系区画を設けた植物栽培試験

AM菌 (*Rhizophagus irregularis*) が感染したミヤコグサ (9 週齢) を低 P 培土が入ったポットに移植し、微生物接種源となる生土とアルギン酸ビーズが入ったメッシュバッグ (菌系区画) を設置した (図 3)。アルギン酸ビーズにはあらかじめ Ca-IHP もしくは Fe-IHP を添加し、対照として P 源無添加区画を設けた。移植後 6 週間後に宿主植物の P 吸収量を測定した。栽培試験終了後、Ca-IHP もしくは Fe-IHP を添加したアルギン酸ビーズは IHP 資化菌の分離および DNA 抽出に用いた。



(2) IHP 含有アルギン酸ビーズからの IHP 分解菌分離および遺伝子解析

IHP 資化菌の分離は、Na-IHP を唯一の P 源とする平板培地で行った。分離した IHP 資化菌は 16S rRNA の配列に基づいて同定を行い、一部の菌株については土壌由来の IHP 分解菌が多く持つ *-propellar phytase* (BPP) 遺伝子配列のシーケンスを行った。IHP 含有アルギン酸ビーズから抽出した DNA は群集構造解析 (DGGE 法, 16S rRNA) および BPP 遺伝子のクローンライブラリー解析を行った。

(3) IHP 資化菌の IHP 分解能評価

分離した IHP 資化菌は、Ca-IHP もしくは Fe-IHP を唯一の P 源とする液体培地 (無機態 P 濃度は 0.04 mg-P/L 以下, pH7.0) で単独培養し、25 暗所で 7 日間震とう培養した。培養後、遠心分離で菌体を除去し、培地上清に遊離した無機態 P 濃度をマラカイトグリーン法で測定した。

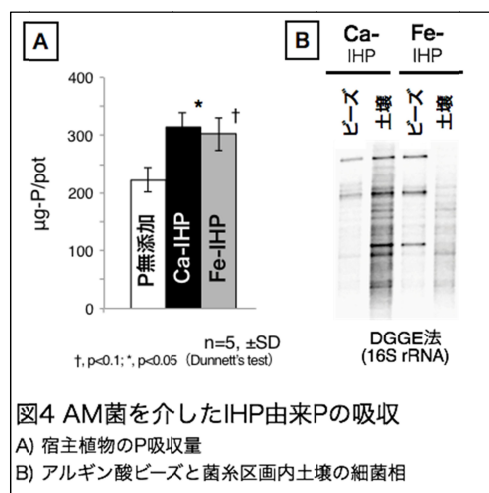
(4) Ca-IHP 分解菌の接種試験

滅菌した畑土壌と Ca-IHP 含有アルギン酸ビーズが入ったメッシュバッグを埋設し、AM菌 (*R. irregularis*) が感染したミヤコグサ (9 週齢) を移植した。この時、Ca-IHP 分解菌 4 株 (*Sphingomonas* sp. 2 株, *Caulobacter* sp. 2 株) をそれぞれ単独でメッシュバッグに接種した。移植後 6 週間栽培したミヤコグサ地上部の P 含量を非接種区と比較した。

4. 研究成果

(1) 菌根菌系区画を設けた植物栽培試験

Ca-IHP および Fe-IHP 含有アルギン酸ビーズ区では P 無添加アルギン酸ビーズ区と比較してミヤコグサの P 吸収量が多かったため、AM 菌を介して IHP 由来の P が吸収されたことが確認された。(図 3-A)。植物根は IHP に接触できないため、IHP 添加による P 吸収量増加は AM 菌を介した吸収であると考えられる。



(2) IHP 含有アルギン酸ビーズからの IHP 分解菌分離および遺伝子解析

Ca-IHP ビーズと Fe-IHP ビーズそれぞれから 96 株と 93 株の IHP 分解菌を分離しところ、Ca-IHP ビーズからは *Sphingomonas* 属細菌と *Caulobacter* 属細菌が、Fe-IHP ビーズからは *Sphingomonas* 属細菌が多く分離され、それぞれのビーズから抽出した DNA 中の主要な 16SrRNA 遺伝子および BPP 遺伝子と良い一致を示した。よって、これらの IHP 分解菌は AM 菌が IHP 由来の P を吸収する際にアルギン酸ビーズ周辺で優占していたと考えられた。この時、IHP 含有アルギン酸ビーズ周辺では土壌と比較して単純な菌相になっており (図 3-B)、IHP 含有アルギン酸ビーズの周辺に IHP 分解に関与する細菌が集積したことが示唆された。

(3) IHP 資化菌の IHP 分解能評価

Ca-IHP 含有アルギン酸ビーズから分離された *Sphingomonas* 属細菌と *Caulobacter* 属細菌の代表的な株の Ca-IHP 分解活性を調べたところ、いずれも比較的高い活性を示した (0.27~2.56 $\mu\text{mol P mL}^{-1}$)。また、Fe-IHP ビーズから分離された *Sphingomonas* 属細菌

および *Arthrobacter* 属細菌はわずかではあるが Fe-IHP 分解能が確認された $0.024 \sim 0.091 \mu\text{mol P mL}^{-1}$ 。これまで Fe-IHP を分解して無機態 P を放出した報告がないため、新規性が高い。また、培地の pH が 3.0 程度に低下したことで、IHP 分解酵素は金属と結合した状態の IHP を分解しないと考えられることから、酸性条件で IHP を Fe-IHP から遊離するメカニズムが存在すると考えられた。さらに、AM 菌菌糸圏内の Fe-IHP 周辺で *Sphingomonas* 属細菌と *Arthrobacter* 属細菌が優占することが菌相解析 (DGGE 法) により確認されているため、本試験で供試した Fe-IHP 分解菌が土壤中において Fe-IHP を分解し、AM 菌に無機態 P を供給した可能性が示された。

(4)Ca-IHP 分解菌の接種試験

分離した Ca-IHP 分解菌 4 株 (*Sphingomonas* 属細菌と *Caulobacter* 属細菌それぞれ 2 株ずつ) を用いて接種試験を行った結果、*Caulobacter* sp. CaGL4 株のみに Ca-IHP 由来 P の吸収促進作用があった。これにより、AM 菌に IHP 由来 P 供給する IHP 分解菌の分離に成功したといえる。

< 引用文献 >

- [1] Feng G. et al., *Applied Soil Ecology*, 22, 139-148
[2] Zhang L. et al., *Soil Biol Biochem*, 74, 177-183, 2014

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 2 件)

- 1) S. Hara and M. Saito. Isolation of inositol hexaphosphate (IHP)-degrading bacteria from arbuscular mycorrhizal fungal hyphal compartment using a modified baiting method involving alginate beads *Microbes and Environments* 査読有 (accepted)
- 2) 鈴木貴恵, 田島亮介, 原新太郎, 清水利規, 宇野亨, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, リン酸肥沃度の高い圃場におけるアーバスキュラー菌根菌: ネギへの接種効果と土着 AM 菌の分離, 土と微生物, 査読有, 69 巻, 2015 年, pp.48-57

[学会発表](計 8 件)

- 1) 原新太郎, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, アーバスキュラー菌根菌のフィチン由来リン吸収におけるフィチン分解菌の寄与, 菌根研究会 2015 年度大会, 2015 年 10 月 31 日, 北海道帯広市
- 2) 原新太郎, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰,

齋藤雅典, AM 菌菌糸圏から分離されたフィチン酸鉄分解菌, 日本土壤肥料学会 2015 年度大会, 2015 年 9 月 9 日, 京都府京都市

- 3) 原新太郎, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, AM 菌を介したフィチン由来 P 吸収を促進するフィチン分解菌, 日本土壤微生物学会 2015 年度大会, 2015 年 5 月 22 日, 茨城県つくば市
- 4) 原新太郎, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, アルギン酸ビーズを利用したフィチン分解菌の局所的集積培養, 環境微生物系合同大会 2014, 2014 年 10 月 22 日, 静岡県浜松市
- 5) 原新太郎, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, AM 菌菌糸圏のフィチン態リン含有アルギン酸ビーズにおいて優占するフィチン分解菌, 日本土壤肥料学会 2014 年度大会, 2014 年 9 月 9 日, 東京都小金井市
- 6) S. Hara, T. Shimizu, T. Uno, R. Tajima, T. Ito, M. Saito, Phosphorus uptake from phytate in organic matter via AM fungi. 20th World Congress of Soil Science, July 12, 2014, Jeju (South Korea)
- 7) 原新太郎, 清水利規, 宇野亨, 田島亮介, 伊藤豊彰, 齋藤雅典, AM 菌を介した有機物由来リン酸利用の可能性 分解有機物周辺に生息するフィチン分解菌の分離, 2013 年 9 月 11 日, 日本土壤肥料学会 2013 年度大会 (愛知県名古屋市)
- 8) S. Hara, T. Shimizu, T. Uno, R. Tajima, T. Ito, M. Saito, Phosphorus uptake from organic matter via AM fungi-Possible involvement of phytate-degrading bacteria-. The 11th international symposium of integrated field science, August 2, 2013, Matsushima (Japan)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原新太郎 (Hara Shintaro)
東北大学・農学研究科・特別教育研究教員
研究者番号: 10647019